



Dynamique du phytoplancton et caractérisation physiologique et moléculaire de trois espèces autotrophes de la saline de Sfax(Tunisie), un milieu extrémophile.

Salma Masmoudi

► To cite this version:

Salma Masmoudi. Dynamique du phytoplancton et caractérisation physiologique et moléculaire de trois espèces autotrophes de la saline de Sfax(Tunisie), un milieu extrémophile.. Sciences agricoles. Le Mans Université; University of Sfax, 2014. Français. NNT : 2014LEMA1015 . tel-01150399

HAL Id: tel-01150399

<https://theses.hal.science/tel-01150399>

Submitted on 11 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de Doctorat



Salma MASMOUTI

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université du Maine / l'université de Sfax
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans / l'université de Sfax*

École doctorale : VENAM / EDSF

Discipline : **Biologie des organismes / Biotechnologies animales, végétales et microbiennes**
Spécialité : **Biologie des organismes / Sciences biologiques**

Unité de recherche : **Laboratoire Mer, Molécules, Santé (EA2160) / UR11ES72 Biodiversité et Ecosystèmes Aquatiques**

Soutenue le 16 Juin 2014

Dynamique du phytoplancton et caractérisation physiologique et moléculaire de trois espèces autotrophes de la saline de Sfax (Tunisie), un milieu extrêmophile

JURY

Président :

Alya SELLAMI -KAMMOUN, Professeur, Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax (Tunisie)

Rapporteurs :

Pascal Jean LOPEZ, Chargé de recherche CNRS, Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris (France)

Abdelhafidh DHOUB, Professeur, Centre de Biotechnologie de Sfax (Tunisie)

Directeur de Thèse :

Annick MORANT-MANCEAU, Professeur, Faculté des Sciences et Technique, Université du Maine (France)

Co-directeur de Thèse :

Habib AYADI, Professeur, Faculté des Sciences de Sfax, Université de Sfax (Tunisie)

Examineur :

Luisa MANGIALAJO, Maître de conférences, Faculté des Sciences Parc Valrose, Université de Nice Sophia-Antipolis (France)

Invitée :

Faiza FAKHFAKH, Professeur, Faculté des Sciences de Sfax, Faculté de Médecine de Sfax (Tunisie)

Co-encadrant de Thèse :

Aurore CARUSO, Faculté des Sciences et Technique, Université du Maine (France)

REMERCIEMENTS

Faire les remerciements... Ce devrait être la partie la plus facile à écrire après avoir rédigé un pavé tel que la thèse. Pourtant, il y a tant de personnes à remercier, qui ont participé de près ou de loin à ce travail. Il faut à la fois n'oublier personne et trouver les mots justes.

*Ma profonde gratitude à Madame **Alya Sellami Kammoun**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax. Vous me faites honneur de présider ma thèse.*

*J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur **LOPEZ Pascal Jean**, Chargé de recherche CNRS au Muséum National d'Histoire Naturelle à Paris (France) et à Monsieur **DHOUIB Abdelhafidh**, Professeur au Centre de Biotechnologie de Sfax, je leur suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger mon travail et d'en être rapporteurs.*

*J'exprime ma sincère gratitude à ma directrice de thèse, Madame **Annick MORANT-MANCEAU**, Professeur à l'Université du Maine, Le Mans (France) pour l'attention avec laquelle elle a suivi le déroulement de ce travail. Elle a dirigé mon travail avec beaucoup de compétence et de savoir faire. Elle m'a aidée par ses conseils éclairés à la mise en forme définitive de ce manuscrit. Ces qualités humaines sont pour moi un exemple. Ses encouragements ont été un précieux soutien. Je la remercie infiniment de m'avoir aidée jusqu'à la fin de la rédaction du manuscrit. Elle m'a chaleureusement accueillie au sein du laboratoire Mer, Molécules, Santé (MMS) lors de mes stages. Je ne sais guère comment la remercier.*

*Mes remerciements les plus vifs sont adressés à Monsieur **Habib AYADI**, Professeur à la faculté des sciences de Sfax et mon co-directeur de thèse de m'avoir accueillie dans son laboratoire de planctonologie en me donnant tous les moyens de travailler dans les meilleures conditions. Il a constamment guidé ce travail en me faisant profiter de sa grande expérience dans le domaine de la planctonologie. Il n'a jamais hésité à me consacrer une partie de son temps pour discuter de mon travail et a toujours fait preuve d'une grande sollicitude à mon égard. J'espère qu'il sera fier de ce travail réalisé en grande partie dans le laboratoire qu'il dirige. Pour ma part, je lui adresse un grand merci. Ses qualités humaines et sa compétence scientifique sont pour moi un exemple. Je garde un excellent souvenir de la qualité de son enseignement.*

*Mon profond respect et ma sincère gratitude à Madame **MANGIALAJO Luisa**, Maître de conférences à l'Université de Nice Sophia-Antipolis (France). Vous me faites l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.*

*J'adresse mes remerciements à madame **FAKHFAKH Faiza**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax et chargé de recherche au Laboratoire de Génétique Moléculaire Humaine à la Faculté de Médecine de Sfax (Tunisie) d'avoir accepté d'en être un membre de mon jury.*

*Je suis profondément reconnaissante à Madame **CARUSO Aurore**, Maître de conférences à l'Université du Maine, Le Mans (France) et ma co-encadrante, de m'avoir initiée à la biologie moléculaire et de son soutien moral. Je la remercie aussi pour le temps qu'elle m'a consacré pour la mise en forme définitive de ce manuscrit. J'ai apprécié sa modestie et ses qualités humaines. Je la remercie vivement de participer à ce jury.*

*Je suis profondément reconnaissante à Monsieur **Wassim GUERMAZI**, Maître assistant à la Faculté des Sciences de Gabès (Tunisie). Il m'a guidée et m'a apportée beaucoup de conseils et m'a fait partager ses connaissances dans le domaine des cultures de micro-algues. Je tiens à le remercier infiniment pour ses énormes efforts afin de finaliser l'article de recherche ; j'ai toujours apprécié sa modestie et ses qualités humaines.*

*J'exprime aussi ma sincère gratitude à Madame **Emmanuelle Tastard**, Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche au laboratoire Mer, Molécules, Santé à l'Université du Maine, pour son aide précieuse pour les analyses statistiques.*

*Je tiens à remercier vivement Madame **Jannet ELLOUMI**, Maître assistante à la faculté des Sciences de Sfax, de m'avoir aidée en mettant à ma disposition son temps, ses connaissances et son soutien moral pour mener à terme ce travail.*

*Je suis profondément reconnaissante à Monsieur **Alain COUTÉ**, Professeur émérite au Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, de m'avoir fait partager ses connaissances afin d'identifier la cyanobactérie *Phormidium versicolor*.*

*J'adresse mes remerciements à Madame **Neila TRABELSI**, Assistante, à Madame **Ikbel SELLAMI**, Maître assistante à la Faculté des Sciences de Gabès, à Monsieur **Zaher Drira**, Maître assistant à la Faculté des Sciences de Gafsa, pour leur aide et leur soutien moral.*

*J'adresse mes remerciements aux thésards du laboratoire MMS : **Sahar KARRAY**, **Fadoumo EGUE**, **Duc Hung NGUYEN**, **Romain GASTINEAU**. Je n'oublierai jamais leur aide précieuse et leur amitié qu'ils m'ont manifestées tout le long de mes stages au Mans. Je leur suis très reconnaissante.*

*J'exprime chaleureusement ma profonde gratitude à tous mes amis de l'unité de recherche qui m'ont entourée de leur sympathie et de leur aide : **Amira REKIK**, **Chiraz LADHAR-HDIJI**, **Hajer KHEMAKHEM**, **Imen HANNACHI**, **Khaled ATHMOUNI**, **Rahma THABET**, **Rayda KOBBI-REBAÏ**, **Salma KMIHA-MEGDICHE**, **Sawssan BAYOUDHCHAABANE**, **Sawssan BOUKHRIS**, **Sihem GHANNAI-BAYAR**, **Thouraya BEN LTAIEF**, **Zohra BEN SALEM**. Je leur suis très reconnaissante pour m'avoir supportée, encouragée et aidée durant l'élaboration de ce travail.*

*J'adresse mes remerciements à tous les chercheurs et les personnels du laboratoire MMS et en particulier à **Sophie HIARD**, Technicienne.*

*J'exprime ma reconnaissance envers la Direction générale ainsi que le personnel de la COTUSAL, particulièrement à Monsieur **Ridha AMDOUNI**, Directeur régional de la COTUSAL qui a facilité notre tâche et l'accès à la saline.*

*Je tiens également à adresser mes remerciements à Monsieur **Fayçal ELLEUCH**, Sous directeur de l'Institut National de la météorologie de Sfax, ainsi que les personnels de cette station, de m'avoir fourni les données météorologies que j'ai demandées.*

Je remercie toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

Guère les mots ne sont suffisants pour exprimer ma profonde gratitude envers mes parents et les membres de ma famille.

A chaque fois que j'apprends de nouvelles connaissances, je réalise encore plus mon ignorance

L'imam Al-Chafii

كلّما ادّبنی الدهر اراني نقص عقلی وکلّما ازددت علما ازداد علمي بجهلي
للإمام محمد بن إدريس الشافعيّ

Table des matières

Table des matières.....	1
Liste des tableaux.....	5
Liste des figures.....	8
Liste des abréviations.....	15
Introduction générale.....	18
Première Partie : Synthèse bibliographique.....	20
1. Exemple de milieu extrême salin : les salines.....	20
2. Les précédentes études effectuées sur la saline de Sfax.....	21
3. Le phytoplancton.....	24
3.1. Les principaux organismes.....	24
3.2. Identification moléculaire des espèces.....	31
4. Principaux mécanismes de défense contre le stress salin chez les micro-algues et les cyanobactéries.....	34
4.1. La photosynthèse.....	37
4.2. Le système anti-oxydant.....	45
4.3. Les différents transporteurs d'ions.....	48
5. Le système Salt Overly Sensitive (SOS) chez les plantes terrestres.....	57
6. L'effet de lumière sur les micro-algues.....	60
Objectifs de ce travail.....	62
Deuxième Partie : Matériel et méthodes.....	64
1. Site d'étude : La saline de Sfax.....	64
1.1. Description géographique, climatique et hydrologique de la saline	64
1.2. Echantillonnage.....	67
1.3. Paramètres mesurés	67
1.3.1. Paramètres abiotiques.....	67
1.3.1.1. Température, salinité, oxygène dissous, densité de l'eau et pH	
1.3.1.2. Matières en suspension (MES).....	68
1.3.1.3. Dosage des éléments nutritifs	68
1.3.2. Paramètres biotiques.....	68
1.3.2.1. Le phytoplancton.....	68
1.3.2.2. Dosage des pigments photosynthétiques.....	69

2. Etude de la réponse physiologique et biochimique des trois micro-organismes cultivés	70
2.1. Conditions de culture au laboratoire	70
2.2. Suivi de la croissance.....	71
2.2.1. La densité cellulaire.....	71
2.2.2. Courbes de croissance	71
2.2.3. Dosage des pigments photosynthétiques et estimation de la taille des antennes	72
2.2.4. Dosage des protéines totales	73
2.3. Mesure de la photosynthèse.....	74
2.3.1. Oxygénométrie.....	74
2.3.2. Fluorimétrie modulée	76
2.4. Activités enzymatiques antioxydants.....	78
2.4.1. Extraction des protéines	78
2.4.2. Mesure des activités enzymatiques.....	79
2.4.2.1. Super oxyde dismutase (SOD).....	79
2.4.2.2. Catalase (CAT).....	79
2.4.2.3. Ascorbate peroxydase (APX).....	80
3. Etude moléculaire.....	80
3.1. Extraction de l'ADN g	80
3.2. Identification moléculaire des trois micro-organismes.....	81
3.3. Recherche du gène SOS1.....	85
3.4. Electrophorèse et purification des fragments amplifiés.....	88
3.5. Ligation, clonage et extraction de plasmides.....	89
3.6. PCR sur colonie et séquençage.....	90
4. Etude comparative en vue d'une culture à grande échelle de <i>Dunaliella salina</i> et d'autres micro-algues d'intérêt commercial	90
4.1. La croissance.....	90
4.2. Les composées biochimiques.....	90
4.3. Les acides gras.....	91
4.4. Calcul de l'énergie et de la productivité des micro-algues.....	92
5. Analyse statistique.....	92
5.1. Analyse STATICO	92
5.2. Analyse d variance (ANOVA).....	94
5.3 Test de Student	94
5.4 Test de Kruskal Wallis.....	94
Troisième Partie : Résultats et Discussion.....	95
Chapitre I : La saline de Sfax	95
1. Les paramètres écologiques.....	95
2. Les communautés phytoplanctoniques.....	101

3. L'analyse statistique STATICO.....	106
3.1. L'inter-structure.....	106
3.2. Le compromis.....	107
3.3. Les trajectoires.....	109
4. Discussion	114
Chapitre II : Détermination des espèces étudiées.....	119
1. Identification par microscopie optique	119
2. Identification moléculaire.....	122
2.1. <i>Dunaliella salina</i>	123
2.2. <i>Cylindrotheca closterium</i>	125
2.3. <i>Phormidium versicolor</i>	129
3. Discussion.....	130
Chapitre III : Etude moléculaires des trois espèces phytoplanctoniques prélevées dans la saline.....	133
1. Recherche du gène SOS1.....	133
2. Discussion.....	138
Chapitre IV : Réponse physiologique des trois espèces phytoplanctoniques	
1. Résultats.....	140
1.1. La croissance.....	140
1.2. Effet du NaCl sur les concentrations en chlorophylles <i>a</i> , <i>b</i> et <i>c</i> et en caroténoïdes.....	146
1.3. La respiration.....	154
1.4. L'activité photosynthétique.....	156
1.4.1. Effet du NaCl et de l'éclairement sur la photosynthèse nette.....	156
1.4.2. Effet du NaCl et de l'éclairement sur les paramètres de fluorescence de la Chl <i>a</i>	158
1.5. Les activités enzymatiques anti-oxydantes.....	163
1.5.1. Activité de la superoxyde dismutase.....	163
1.5.2. Activité de la catalase.....	163
1.5.3. Activité de l'ascorbate peroxydase.....	163
2. Discussion.....	165
Chapitre V : Etude comparative entre <i>Dunaliella salina</i> et des micro-algues d'intérêt commercial	177
1. Résultats.....	177
1.1. La croissance.....	177
1.2. Les composées biochimiques.....	180

1.3. Les acides gras.....	181
1.4. Energie et productivité des micro-algues.....	183
2. Discussion	184
Quatrième Partie : Discussion générale.....	188
Cinquième Partie : Conclusions et perspectives.....	193
Bibliographie.....	195
Annexe.....	i

Liste des tableaux

Tableau 1. Nom, séquence et température d'hybridation des amorces utilisées pour identifier les différents microorganismes. Abréviations : **F** : Forward (amorces sens), **R** : Reverse (amorces anti-sens), **N** : Nested (amorce chevauchante) **S** : G / C; **R** : G / A; **M** : A / C; **W** : A / T; **K** : G / T; **Y** : T / C.....83

Tableau 2. Nom, séquence et température d'hybridation des amorces utilisées pour identifier le gène SOS1. Abréviations : **F** : Forward (amorces sens), **R** : Reverse (amorces anti-sens), **N** : Nested (amorce chevauchante) **S** : G / C; **R** : G / A; **M** : A / C; **W** : A / T; **K** : G / T; **Y** : T / C.....86

Tableau 3 a. Les paramètres physico- chimiques au cours de la période étudiée dans les sept bassins d'échantillonnage de la saline de Sfax (Juin2010 à Mai 2011), Abréviations : **S** : salinité; **D**, densité : MES, matière en suspension; **T** : température; **D-O₂** : oxygène dissous; **Moy** : moyenne; **Ecar** : écart-type; **Min** : minimum; **Max** : maximum.....96

Tableau 3 b. Les éléments nutritifs ($\mu\text{mol L}^{-1}$) au cours de la période étudiée dans les sept bassins d'échantillonnage de la saline de Sfax (Juin2010 à Mai 2011), Abréviations : **NO₂⁻** : nitrites; **NO₃⁻** : nitrates; **NH₄⁺** : ammonium; **PO₄³⁻** : ortho-phosphates; **T-P** : phosphore total; **T-N** : azote total; **SiO₃²⁻** : silicates; **Moy** : moyenne; **Ecar** : écart-type; **Min** : minimum; **Max** : maximum.98

Tableau 3 c. Les concentrations en pigments ($\mu\text{g L}^{-1}$) et l'indice de diversité spécifique **H'**

Chl a : chlorophylle *a*; **Chl b** : chlorophylle *b*; **Chl c** : chlorophylle *c*; **Car** : caroténoïdes; **H'** : indice de diversité de Shannon–Weaver's; **Moy** : moyenne; **Ecar** : écart-type; **Min** : minimum; **Max** : maximum.100

Tableau 4. Contribution relative (%) de chaque taxon de phytoplancton total dans chaque bassin. Les Optimum et les tolérances de salinité ont été calculés pour chaque espèce.....104

Tableau 5. Les caractères taxonomiques distinctifs entre les deux Cyanophycées (cyanobactéries) : *Leptolyngbya cebennensis* et *Phormidium versicolor*.....121

Tableau 6. Récapitulatifs des différentes PCR réalisées, afin de détecter le canal SOS1 chez *Dunaliella salina*.....135

Tableau 7. Taux de croissance spécifique, temps de doublement et densité cellulaire (ou concentration en chlorophylle *a*) maximale de *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et

Phormidium versicolor cultivés dans de l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Moyenne \pm SD (n=3)

.....143

Tableau 8. Effet de la salinité, de l'éclairage et leur interaction sur le taux de croissance spécifique et le temps de doublement chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans de l'eau de mer artificielle (Analyse de variance de deux facteurs avec répétition d'expérience). d.d.l =18. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.....145

Tableau 9. Effet de la salinité, de l'éclairage et leur interaction sur la teneur en Chl *a*, Chl *b* ou *c* et caroténoïdes ou fucoxanthine chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* pendant la phase exponentielle de croissance (A) et la phase stationnaire (B). Analyse de variance de deux facteurs avec répétition d'expérience. d.d.l =18. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.....151

Tableau 10. Estimation de la taille des antennes chez *Dunaliella salina* (Chl *a*/ Chl *b*) et *Cylindrotheca closterium* (Chl *a*/ Chl *c*) cultivées dans l'eau de mer artificielle renfermant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Moyenne \pm DS (n=3).....152

Tableau 11. Effet de la salinité, de l'éclairage et leur interaction sur la taille des antennes, sur l'intensité respiratoire et la photosynthèse nette chez *Dunaliella salina* et *Cylindrotheca closterium* pendant la phase exponentielle (A) et en phase stationnaire (B). Analyse de variance de deux facteurs avec répétition d'expérience, d.d.l =18.*p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001.....153

Tableau 12. Intensité respiratoire de *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance. Moyenne \pm SD (n = 3).....155

Tableau 13. Effet de la salinité, de l'éclairage et leur interaction sur le rendement quantique maximal (F_v/F_m), sur le rendement quantique effectif du PS II (ΦPS2) et sur le quenching non photochimique (QNP) chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* pendant la phase exponentielle (A) et en phase plateau (B) cultivés

dans de l'eau de mer artificielle (Analyse de variance de deux facteurs avec répétition d'expérience). d.d.l = 18. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$162

Tableau 14. Taux de croissance (μ) densité cellulaire maximale et concentration en composées biochimiques enregistrées, (protéines (P), sucres (S) et lipides (L)), chez *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella salina* et *Isochrysis galbana*, cultivées à $27 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sous une lumière continue (24L) et un régime photopériodique (12L: 12O). Moyenne \pm SD (n=3). La même lettre signifie qu'il n'y a pas de différences (P : 0,05%) pour chaque espèce. (*) $P < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$: différence significative à 0,05; 0,01 et 0,001 (Test de Student). nd : non détecté.....179

Tableau 15. Effet de lumière continue (24L) et photopériodique (12L: 12O) sur la composition des acides gras (% du total des acides gras) chez *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella salina* et *Isochrysis galbana* cultivées à $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, récoltées à la fin de la phase exponentielle de croissance. Moyens \pm SD (n = 3). Les acides gras représentant moins de 5% des acides gras totaux chez les quatre espèces ne sont pas mentionnés dans ce tableau, mais ils sont pris en compte dans la sommation du totale. Abréviations: EPA : acide eicosapentaénoïque, DHA: acide docosahexaénoïque, AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras mono-insaturés, AGPI : acides gras poly-insaturés. Pour chaque espèce, la même lettre signifie qu'il n'y a pas de différence entre les niveaux d'éclaircissements (test de Student, 0,05%) ; Abréviations : Tr : traces ; - : non détecté.....183

Tableau 16. Principales caractéristiques de la saline de Sfax.....188

Liste des figures

Figure 1A. Vue aérienne de la saline de Sfax (Tunisie)	21
Figure 1B. Localisation des stations d'échantillonnage des études antérieures effectuées dans la saline de Sfax (Ayadi et al., 2002, 2004; Toumi et al., 2005; Abid et al., 2008; Elloumi et al., 2009; Kamekem et al., 2010; Kobbi-Rebai et al., 2013)	21
Figure 2. Distribution de l'abondance moyenne du phytoplancton au niveau de la saline de Sfax (Abid, 2009).....	23
Figure 3. Vue d'ensemble schématique des composants siliceux des parois cellulaires des diatomées. Dessin de Ian Nettleton (Zurzolo et Bowler, 2001).....	25
Figure 4. Auxosporulation chez deux clones sexuellement compatibles CCN 148.78 (petite cellule) et de la CCN 320 (cellule plus grande) de <i>Haslea ostrearia</i> A: Couplage des cellules parentales. B: Deux gamètes (à droite) et un zygote (à gauche) à proximité du frustule parental déhiscent. C: une auxospore. D: cellule initiale à l'intérieur de son perizonium (Gastineau, 2011).....	27
Figure 5. Formation et libération de baeocyte chez la cyanobactérie <i>Dermocarpella gardneri</i> (Montejano et Leon-Tejera, 2002).....	29
Figure 6. Les différents stades de la reproduction sexuée chez <i>D. salina</i> : Fusion (A), (B), (C) (D).....	30
Figure 7. Schéma des gènes de l'ARNr ribosomique eucaryote 18S; 5,8 S; 28S; ITS1 et ITS2 (Coleman, 2003, modifié).....	31
Figure 8. Principales étapes de la réponse de <i>Dunaliella salina</i> à un stress salin (Chen et Jiang, 2009).....	34
Figure 9. Schéma de la photosynthèse au niveau d'un thylacoïde. A: transfert acyclique des électrons, B: transfert cyclique des électrons, (http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/). Abréviations : OEC: Oxygen Evolving Complex, LHCI et II: antenne du PSI et PSII, Pheo : phéophytine; Q: Quinones, PQ/PQH ₂ : plastoquinone oxydée / réduite, Cytb6-f : complexe des cytochromes, PC: plastocyanine, FD: ferredoxine, FNR: Ferredoxine NADP Réductase, PS I et PS II :	

photosystèmes I et II, P680 et P700: centre réactionnel du photosystème II et du photosystème I.....38

Figure 10. Schéma de l'organisation des antennes collectrices du photosystème II dans la membrane des thylakoïdes des plantes et des micro-algues (A), des cyanobactéries et des Rhodophytes (B). (<http://photoscience.la.asu.edu/photosyn/photoweb/>). Abréviations : Cyt, cytochrome; Phéo, Phéophytine; Lhc, antenne collectrice de la lumière; PQH₂, plastoquinone; P680, centre réactionnel du PS II; Q_A et Q_B, quinones A et B.....39

Figure 11. Schéma de l'appareil photosynthétique chez les cyanobactéries (<https://www.bio.purdue.edu/lab/sherman/>). Abréviations : Q: Quinones, PQ/PQH₂: plastoquinone, Cyt b6-f: complexe protéique cytochromes, PC: plastocyanine, FD: ferredoxine, FNR: Ferredoxine NADP Réductase41

Figure 12. Modèle hypothétique expliquant l'inactivation de l'appareil photosynthétique induit par le NaCl chez *Synechococcus* sp (Allakhverdiev et al., 2000a). I:PSI, II:PSII, les cercles noirs: protéines extrinsèques à savoir la protéine de 33 kDa, cytochrome c550, et PsbU; le triangle noir: protéine associée au PSI, à savoir, la plastocyanine ou cytochrome c553.....43

Figure 13. Schéma du mécanisme antioxydant enzymatique dans une cellule foliaire chlorophyllienne (Cycle de Asada-Halliwel dans le chloroplaste, Rijstenbil, 2002).....46

Figure 14. Evolution des antiports cation-proton appartenant aux familles CPA1 et CPA2 (Chanrojet al., 2012).....50

Figure 15. Evolution des gènes de type CPA1 (Chanrojet al., 2012).....51

Figure 16. Différents canaux identifiés chez le genre *Dunaliella* (Chen et Jiang, 2009).....55

Figure 17. Schéma du système Salt Overly Sensitive (SOS). L'augmentation de la teneur en NaCl dans le milieu extérieur entraîne une augmentation de la teneur intracellulaire en Ca²⁺. Le Ca²⁺ se fixe sur la protéine SOS3. Celle-ci active la protéine SOS2 qui va phosphoryler SOS1. Ce dernier devient alors actif et expulse des ions Na⁺ en dehors de la cellule (Novikova et al., 2007; Bertorello et Zhu, 2009).....59

Figure 18. Efflux de Na⁺ d'une cellule et son compartimentage vacuolaire grâce au système SOS (Munns et Tester, 2008).....59

Figure 19. Carte et photographie satellite du site d'étude : la saline de Sfax.....	66
Figure 20. Schéma représentant les différents partènements de la saline de Sfax et montrant l'hydrodynamisme des eaux (Elloumi, 2006).....	66
Figure 21. Courbe de croissance théorique de micro-organismes cultivés en « batch » en fonction du temps.....	72
Figure 22. Les différents composants du dispositif de mesure de la photosynthèse et de la respiration par oxymétrie.....	74
Figure 23. Appareillages composant le dispositif de mesure de la fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> des micro-algues.....	78
Figure 24. Exemple d'enregistrement de la fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> de <i>Dunaliella salina</i> en fonction du régime lumineux.....	78
Figure 25. Schéma général de l'emplacement de quelques amorces utilisées en PCR afin d'identifier les différentes espèces. Abréviations : F = Forward (amorce sens), R = Reverse amorce (amorce anti-sens), N = Nested (amorce chevauchante).....	82
Figure 26. Alignement des séquences nucléotidiques du gène 18S chez <i>Cylindrotheca closterium</i> , <i>Nitzschia longissima</i> et <i>Nitzschia palea</i>	84
Figure 27. Schéma général de l'emplacement de quelques amorces utilisées en PCR afin de rechercher le gène SOS1. Abréviations: F = Forward (amorce sens), R = Reverse amorce (amorce anti-sens).....	85
Figure 28. Alignement des séquences nucléotidiques du gène SOS1 chez <i>Ectocarpus siliculosus</i> et <i>Ostreococcus lucimarinus</i>	87
Figure 29. Alignement des séquences nucléotidiques du gène SOS1 chez <i>Cymodocea nodosa</i> et <i>Ostreococcus lucimarinus</i>	88
Figure 30. Produits de clonage mis en culture sur boîte de Pétri.....	89
Figure 31. Abondance relative des différents groupes phytoplanctoniques par apport au phytoplancton total dans les sept bassins de salinité croissante, Euglenophyceae et diatomées centriques ne sont pas présentés, Ils représentent moins de 0,2%.....	103

Figure 32. L'analyse STATICO présentant la carte factorielle de l'inter-structure. La longueur des flèches indiquant les dates d'échantillonnage les plus importantes : l'échantillonnage a été effectué durant la période allant du mois de Juin au mois de Décembre 2010 et du mois de Mars au mois de Mai 2011.....107

Figure 33. Carte factorielle du compromis de l'analyse STATICO : Projection des variables environnementales sur un graphique. Les abréviations des variables sont indiquées dans le tableau 3. Cadre A : projection moyenne des variables pour chaque bassin. Cadre B : projection moyenne des espèces pour chaque bassin. Les Abréviations des espèces sont indiquées sur le tableau 5. Les couleurs sont utilisées pour distinguer les classes: vert : Chlorophyceae; bleu pâle : Cyanophyceae; bleu foncé : Dinophyceae; rouge : Bacillariophyceae ou diatomées; violet : Euglenophyceae. La taille des lettres indique le niveau de tolérance des espèces. La superposition des deux cartes nous renseigne sur la partie stable des relations entre l'environnement et le phytoplancton.....109

Figure 34. L'analyse STATICO présentant les trajectoires des variables d'environnement et des espèces. A- une projection des variables environnementales sur la carte factorielle à chaque date. Les abréviations des variables sont indiquées sur le tableau 4. B- une projection des espèces sur la carte factorielle à chaque date. Les abréviations des espèces sont indiquées sur le tableau 5. Les couleurs sont utilisées pour distinguer les classes (voir Figure 36, tableau 5).....112

Figure 35. L'analyse STATICO montrant les trajectoires des différents bassins : Projection des bassins d'échantillonnage sur la carte factorielle à chaque date. Pour chaque bassin, le point noir indique la projection des variables de l'environnement et le cercle indique la projection de l'espèce.....113

Figure 36. Photographies de *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor* prises en microscopie optique (G x40).....120

Figure 37. Photographies de *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor* respectivement prises en microscopie optique (G x100).....120

Figure 38. Photographies de *P. versicolor* effectuées par PR. Alain Couté.....121

Figure 39. Produits PCR amplifiés avec les amorces F18S/R18S du gène 18S, FITS1/ RITS2 du gène ITS et FrbcL1/RrbcL7 du gène rbcL chez *Dunaliella salina*. Abréviations : M :

marqueur de taille; pb : paire de bases; 18S : gène 18S amplifié à partir des amorces désignées sur l'alignement de séquences de ce gène chez *Haslea* spp.; ITS : gène amplifié à partir des amorces désignées sur l'alignement de séquences du gène ITS chez *Pseudo-nitzschia multistriata*; rbcL : gène rbcL amplifié à partir des amorces désignées sur l'alignement des séquences du gène rbcL chez *Sellaphora* spp.....123

Figure 40. Alignement ClustaW des séquences de la banque de données NCBI de *D. salina* (souche israélienne : DQ116743.1) et de la séquence obtenue chez *Dunaliella salina* (souche tunisienne, n° d'accession en cours d'obtention) cultivée au laboratoire. Les (*) représentent 100 % d'identité entre les séquences pour le gène ITS.....124

Figure 41. Produits PCR amplifiés par les amorces F18S/R18S, FNitITS2/ RNitITS2, FITS1/ RITS2, FcylindroITS2/ RcyllindroITS2 et FrbcL1/RrbcL7 chez *Cylindrotheca closterium*. Abréviations : M : marqueur de taille; pb : paire de bases; 18S : gène 18S amplifié à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences gène 18S chez *Haslea* spp; ITS_{NIT} : gène amplifiée à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences du gène ITS chez *Nitzschia*; ITSCYL : gène amplifiée à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences du gène ITS chez *Cylindrotheca* spp; ITS : gène amplifié à partir des amorces désignées sur un alignement de séquences du gène ITS chez *Pseudo-nitzschia multistriata*, gène rbcL amplifié à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences chez *Sellaphora* spp.....125

Figure 42. Alignement ClustaW des séquences de la banque de données NCBI *Cylindrotheca closterium* (DQ178314.1.) et de la séquence obtenue chez *Cylindrotheca closterium* (souche Tunisienne, N° d'accession en cour d'obtention) cultivée au laboratoire, Les (*) représentent 100 % d'identité entre les séquences pour le gène 18S.....126

Figure 43. Alignement Clusta W des séquences ITS de la banque de données NCBI *Nitzschia* sp. (GQ330363.1) et de la séquence obtenue (A : 600 pb, B : 300 pb) chez *Cylindrotheca closterium* (souche tunisienne) cultivé au laboratoire.....128

Figure 44. Produits amplifiés par PCR du gène 16S avec les amorces externes F/Rph16S et internes NF/NRph16S chez *Phormidium versicolor*. Abréviations : pb : paire de bases; M : marqueur de taille; 16S : gène amplifié à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences du gène 16S gène amplifié à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences de ce gène chez 7 espèces chez *Phormidium* sp.129

- Figure 45.** Alignement Clusta W des séquences 16S de la banque de données NCBI *Phormidium* sp. (AM398802.1) et de la séquence obtenue 600 pb chez *Phormidium versicolor* (souche tunisienne, N° : NCC466 *Phormidium versicolor* / Wartmann in Rabenhorst 1861 ex Gomont 1892) cultivée au laboratoire.....130
- Figure 46.** Produits d'amplification par PCR de l'ADNg de *D. salina*133
- Figure 47.** Exemple de séquence de 600 pb avec l'amorce ROS1R2 qui s'hybride de part et d'autre de la séquence *Dunaliella salina*134
- Figure 48.** Exemple de séquence avec le couple d'amorces OS1F1/ROS1R4 qui s'hybride correctement de part et d'autre de la séquence ayant une taille égale à 600 pb chez *Dunaliella salina*.....135
- Figure 49.** Exemple de séquence avec le couple d'amorces FCYMO1/RCYMO1 qui s'hybride de part et d'autre de la séquence ayant une taille égale à 500 pb chez *Phormidium versicolor*.....136
- Figure 50.** Exemple de séquence avec le couple d'amorces FCYMO1/RCYMO1 qui s'hybride de part et d'autre de la séquence ayant une taille égale à 600 pb chez *Cylindrotheca closterium*.....137
- Figure 51.** Exemple de séquence avec le couple d'amorces FCYMO2/RCYMO1 qui s'hybride correctement de part et d'autre de la séquence ayant une taille égale à 300 pb chez *Cylindrotheca closterium*.....138
- Figure 52.** Courbes de croissance de *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans de l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E300, E500 et E1000). Moyenne \pm SD (n=3).....142
- Figure 53.** Concentrations en chlorophylles *a*, *b*, *c* et en pigments caroténoïdes ($\mu\text{g mL}^{-1}$) chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans l'eau de mer artificielle renfermant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E300, E500 et E1000) pendant la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Moyenne \pm SD (n=3).....148
- Figure 54.** Photosynthèse nette chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E300, E500 et E1000)

pendant la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Moyenne \pm SD (n=3).....157

Figure 55. Effet du NaCl et de l'éclairement sur le rendement quantique maximal (F_v/F_m), le rendement quantique effectif du PS II (Φ_{PS2}) et le quenching non photochimique (QNP) chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans de l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairement de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Moyenne \pm SD (n=3).....160

Figure 56. Activité de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de l'ascorbate peroxydase (APX) chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor*, cultivés dans l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairement de 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Moyennes \pm SD (n = 3).....164

Figure 57. Courbes de croissance de *Chlorella vulgaris* (a), *Nannochloropsis* sp. (b), *Dunaliella salina* (c), et de *Isochrysis galbana* (d) cultivées dans le milieu Walnes modifié (1990) sous 27 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et en lumière continue (24L) ou un régime photopériodique (12L: 12O). Moyenne \pm SD (n=3).....178

Figure 58. Concentrations en protéines, glucides solubles et lipides (pg cellule^{-1}) chez *Chlorella vulgaris* (a), *Nannochloropsis* sp. (b), *Dunaliella salina* (c), et de *Isochrysis galbana* (d) cultivées sous 27 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en lumière continue (24L) et sous régime photopériodique 12 h de lumière / 12 h d'obscurité (12L: 12O). Les jours où les cellules ont été récoltées sont indiqués sur l'axe horizontal. Moyens \pm SD (n = 3).....181

Liste des abréviations

·H : radical hydrogène
·O₂ : anion superoxyde
·OH : radical hydroxyle
23S et 16S : gène ribosomal chez les procaryotes
ACP : Analyse de la composante principale.
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNg : acide désoxyribonucléique génomique
AGMI : acides gras mono-insaturés
AGPI : acides gras poly-insaturés
AGS : acides gras saturés
AP : activité photosynthétique
APX : ascorbate peroxydase
ARNr LSU : la grande sous unité ribosomique
ARNr SSU : la petite sous unité ribosomique
ARNr, 18S, 5,8 S et 28 S ARNr : gène ribosomal chez les eucaryotes
ATP : adénosine tri-phosphate
ATPase : adénosine tri-phosphatase
atpB : gènes chloroplastiques codant pour les sous unités β de l'ATP synthétase
BET : bromure d'éthidium
BSA : bovin serum albumin= L'albumine de sérum bovin
CAT : catalase
Chl *a* : chlorophylle *a*
Chl *b* : chlorophylle *b*
Chl *c* : chlorophylle *c*
coxI : mitochondrial cytochrome oxidase
CPA : monovalent cation-proton antiporter = antiport cation- proton monovalent
CTAB : cetyl trimethylammonium bromide
D1 : protéine du système PS II
dCTP : déoxycystidine triphosphate
DEPC : diéthyl pyrocarbonate
DHA : monodéhydroascorbate
DHA: acide docosahexaénoïque
dNTP : mélange des quatre désoxyribonucléotides
DO : densité optique
DTT : dithiothréitol
E300, E500 et E1000 : éclaircissement de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$
EDTA: acide éthylène-diamine-tétra acétique
EDTA-Na₂ : acide éthylène-diamine-tétra acétique, dis- sodium
EMA : eau de mer artificielle
EPA: acide eicosapentaénoïque

F : Forward
FeCN : ferricyanure
F_m : fluorescence maximale (à l'obscurité)
F_m' : fluorescence maximale (à la lumière)
FNR : ferrédoxine
F_o : fluorescence minimale (à l'obscurité)
F_s : fluorescence stable (à la lumière)
F_v : fluorescence variable (à la lumière)
F_v/F_m : rendement quantique maximal du PS II (à l'obscurité)
G : temps de doublement
GPX : glutathion peroxydase
GR : Glutathione Reductase
GSH : glutathion
H⁺-ATPases : pompe prton /adénosine tri-phosphatase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
IP : intensité photosynthétique
IPTG : isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
ITS: Espaceur Interne transcrit
J : Joule
kDa : kilodalton
LA: sources lumineuses actinique
LB : Luria Bertani
LHC : complexe pigments-protéines collecteur de lumière
LHCP : antennes intrinsèques
LM : sources lumineuses analytique
Met : méthionine
Mn : manganèse
N : Nested
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NBT : bleu de nitrotétrazolium
O₂ : dioxygène
p.s.u : Practical Salinity Unit
P: Phosphore
Pb : Paire de base
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PS I : photosystème I
PS II : photosystème II
PsbU : protéine extrinsèque du photosystem II
QA : quinone

QNP : quenching non-photochimique
qP : quenching photochimique
R : Reverse
rbcL : gène ribulose-bisphosphate carboxylase

rETR : relative electron transport rate = taux de transport d'électron relatif
rETRmax : maximum relative electron transport rate = taux de transport d'électron relatif maximale
ROS : reactive oxygen species = dérivé réactif de l'oxygène
Rpm : rotation par minute
rpoC1 : gène polymérase
SD: standard deviation = écart type
SOD : superoxyde dismutase
STATICO, co-inertie : analyse triadique partielle.
STN7 kinase : (Sérine/thréonine protéine kinase)
Taq polymérase: enzyme isolée à partir de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*
TE : Tris-EDTA
TRIS : trishydroxyméthylaminométhane
Tris-HCl : trishydroxyméthylaminométhane- hydrochloride
U.E. : unité enzymatique
UV : ultra violet
X-Gal : 5-bromo 4-chloro 3-indolyl-galactopyranoside
Ymax : densité cellulaire maximale
 μ : taux de croissance spécifique
 Φ PS II : rendement quantique du PS II

INTRODUCTION



Introduction générale

Le phytoplancton constitue la base des chaînes alimentaires des éco-systèmes aquatiques (Dufour et Durand 1982 ; Koffi et al., 2009). Les micro-organismes constituant le phytoplancton sont dotés de performances et de plasticité leur permettant de coloniser tout type de milieu tel que : les eaux douces, les océans, les sebkhas et les salines.

Notre étude a porté sur la saline de Sfax qui est un milieu de transition entre terre et mer. Elle abrite un phytoplancton diversifié ayant des mécanismes moléculaires et physiologiques efficaces assurant l'homéostasie cellulaire. La fluctuation des différents facteurs environnementaux (tels que l'intensité de la lumière et la concentration en sel) peuvent perturber la croissance, la concentration en chlorophylle et la photosynthèse des organismes photosynthétiques (Greenway et Munns, 1980; Netondo et al., 2004; Perrine et al., 2012). Ces organismes autotrophes perçoivent les variations de leur environnement qui déclenchent des messagers chimiques (Véry, 1998) dont des facteurs de transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress. Cette machinerie contrôle l'expression de l'ensemble des gènes codant des protéines intervenant dans l'acclimatation ou l'adaptation au stress salin (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998).

Trois espèces phytoplanctoniques ont été isolées de la saline de Sfax : deux micro-algues, *Dunaliella salina* et *Cylindrotheca closterium* et, une cyanobactérie, *Phormidium versicolor*. Ces espèces ont été identifiées et cultivées au laboratoire. A partir des cultures réalisées dans différentes conditions expérimentales, nous avons pu déterminer l'impact du NaCl sur des paramètres physiologiques et biochimiques des deux micro-algues et de la cyanobactérie.

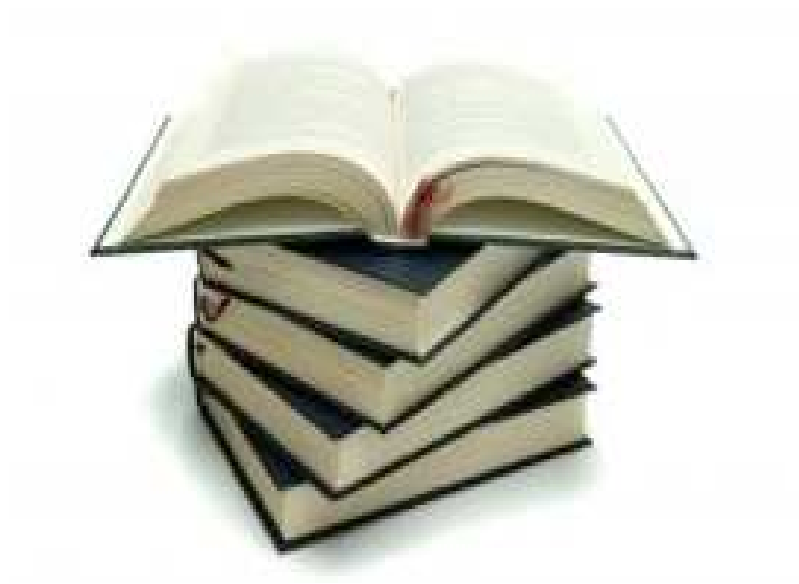
Ce manuscrit est composé de cinq parties :

- la première est consacrée à des études préalables sur la saline de Sfax, des généralités sur le phytoplancton, les effets du stress salin sur différents paramètres physiologiques et biochimiques ainsi que des mécanismes de défense déclenchés par le phytoplancton,
- la deuxième partie présente les espèces étudiées, leur identification moléculaire, ainsi que les différentes techniques analytiques utilisées (physiologiques, biochimiques et moléculaires). Un autre volet traite l'aspect écologique de la saline de Sfax pendant environ un an afin de délimiter les seuils de tolérance et la relation stable entre les espèces et les paramètres environnementaux, lorsque les deux varient au cours du temps.
- la troisième partie est subdivisée en cinq chapitres.

- le premier concerne les paramètres écologiques de la saline de Sfax analysés avec STATICO,
 - le deuxième chapitre présente l'identification des espèces
 - le troisième chapitre traite et analyse les résultats de la recherche du gène codant l'antiport SOS1 chez la Chlorophycée *Dunaliella salina*, la diatomée *Cylindrotheca closterium* et la cyanobactérie *Phormidium versicolor*
- le quatrième chapitre est consacré à la réponse physiologique des trois espèces sous l'effet du NaCl à différents niveaux d'éclairement. Le dernier chapitre porte sur un essai de valorisation de la Chlorophycée *D. salina* et de trois autres espèces commerciales cultivées sous faible éclairement et sous deux régimes lumineux différents. la quatrième partie traite la discussion générale qui reprend l'ensemble des résultats obtenus chez les espèces étudiées.
- la cinquième partie présente les perspectives ouvertes par ce travail.

Première Partie :

Synthèse bibliographique



Première Partie : synthèse bibliographique

La vie existe sur une gamme étendue de concentrations en sel rencontrées dans les habitats naturels partant de l'eau douce jusqu'aux marais salants (ou salines). Bien que la saline soit un milieu hostile, une diversité d'organismes eucaryotes et procaryotes y vivent. Les fortes salinités ont un effet néfaste sur les micro-organismes (Wutipraditkul et al., 2005), mais ces derniers sont capables d'ajuster leur pression osmotique pour contrer l'effet dénaturant du sel (Kempf et Bremer, 1998; Apse et Blumwald, 2002; Rontein et al., 2002; Zhu, 2003). Le stress salin entraîne la modification des fonctions vitales comme la photosynthèse et la synthèse d'acides aminés (Kawasaki et al., 2001; Ozturk et al., 2002; Seki et al., 2002). Pour lutter contre le stress osmotique, les organismes ont la capacité d'accumuler des molécules organiques de faible masse moléculaire, appelées osmolytes ou osmoticums ou composés osmoprotecteurs, comme la glycine-bétaïne, les polyols et la proline (Mishra et al., 2008). Un autre mécanisme d'adaptation au sel est l'exclusion d'ions sodium des cellules (Hamada et al., 2001; Apse et Blumwald, 2002).

1. Exemple de milieu extrême salin : les salines

Les environnements hypersalés incluent les étangs d'évaporation, les lacs naturels et les salines (Lynn et al., 2001). Les salines sont des écosystèmes littoraux dits paraliques, naturels ou artificiels. Ce sont des écosystèmes de transition entre le domaine marin et le domaine continental. Ces biotopes sont formés de bassins cloisonnés, interconnectés, de salinité croissante allant de l'eau de mer jusqu'aux bassins sursalés. Ils abritent des flores et des faunes diversifiées (Elloumi, 2006). Plusieurs salines ont fait l'objet d'études écologiques telles que la saline de Las Salinas del Pinet en Espagne (Asencio, 2013), la saline de Ban Laem district en Thaïlande (Chatchawan et al., 2011), la saline du sud ouest de l'Inde (Nagasathya et thajuddin, 2008) et la saline de Guerrero Negro au Mexique (Nübel et al., 2000). Le climat méditerranéen favorise et accélère l'évaporation et par conséquent la production des salines. Par conséquent, le pourtour méditerranéen est riche en salines. On peut citer par exemple : la saline de Giraud en France (Thiery et Puente, 2002), les marais d'Espagne (Alonso, 1990), la saline en Grèce (Dolapsakis et al., 2005) et la saline de Sfax en Tunisie (Ayadi et al., 2002).

La plupart des études biologiques sur les marais salants concernent essentiellement l'écologie, la biogéographie, la caractérisation biochimique, la valorisation des bactéries halophiles (Oren, 2000), la microalgue *Dunaliella salina* en tant que source naturelle de β -

carotène (Olmos et al., 2009) et les autres espèces phytoplanctoniques en tant que sources nutritionnelles naturelles pour l'aquaculture (Dolapsakis et al., 2005).

2. Précédentes études effectuées sur la saline de Sfax



Figure 1A. Vue aérienne de la saline de Sfax (Tunisie)

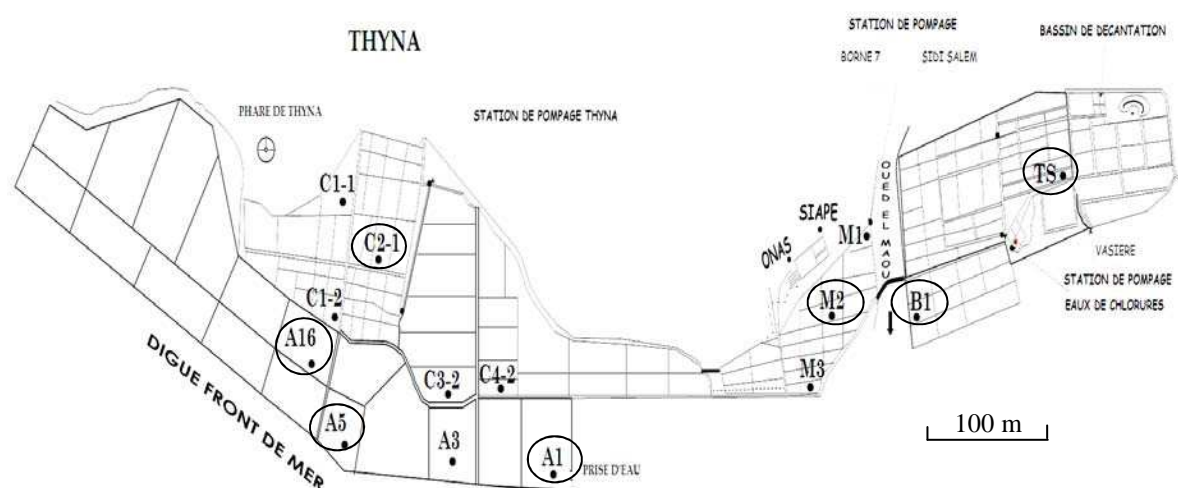


Figure 1B. Localisation des stations d'échantonnage des études antérieures effectuées dans la saline de Sfax (Ayadi et al., 2002, 2004; Toumi et al., 2005; Abid et al., 2008; Elloumi et al., 2009; Khemakhem et al., 2010; Kobbi-Rebai et al., 2013)

La saline de Sfax (Fig. 1A, 1B) est un milieu paralique important du point de vue économique et écologique. Plusieurs études ont été réalisées sur ce milieu depuis une dizaine d'années (Ayadi et al., 2002, 2004; Toumi et al., 2005; Abid et al., 2008; Elloumi et al., 2009; Khemakhem et al., 2010; Kobbi-Rebai et al., 2013). Elles ont porté sur les paramètres physico-chimiques et leurs interactions avec certains micro-organismes procaryotes et

eucaryotes qui y résident. Ces derniers constituent le plancton (Ayadi et al., 2002; Toumi et al., 2005; Abid et al., 2008; Elloumi et al., 2009; Khemakhemet al., 2010).

Les premières études, initiées sur la saline de Sfax, portent sur les relations entre les facteurs environnementaux et le phytoplancton dans les deux bassins (A1 et C21) de salinités différentes (40 et 90) pendant 10 mois (Ayadi et al., 2004). Les dinoflagellés et les diatomées dominent largement le phytoplancton dans ces bassins. L'analyse en composantes principales (ACP) a mis en évidence une distribution du phytoplancton en fonction de la salinité. En effet, les diatomées se développent préférentiellement dans le bassin de faible salinité (40) alors que les dinoflagellés sont dominants dans le bassin le plus salé (90). Le calcul de l'indice de diversité pigmentaire et de l'indice de diversité spécifique, reflétant l'état physiologique des communautés phytoplanctoniques, indique que le phytoplancton, peuplant ces deux bassins, présente un stade juvénile, puisque cet indice est inférieur à 1. Dans le cas de la saline de Sfax, les contraintes environnementales (surtout le sel) empêchent le phytoplancton d'atteindre le stade mature. Ainsi, les facteurs environnementaux jouent un rôle dans la structuration des communautés planctoniques.

Les études qui suivent (Abid et al., 2008; Elloumi et al., 2009; Khemakhemet al., 2010) prennent en considération plusieurs bassins de salinités croissantes allant de 40 à 400. Ces auteurs constatent que la différence floristique est nette entre les différents bassins avec une diminution en nombre de taxons qui suit l'augmentation de la salinité (Fig. 2). Les diatomées comportant majoritairement *Biddulphia* sp., *Chaetoceros* sp., *Gyrosigma attenuatum*, *Navicula* sp., *Nitzschia longissima*, *Pleurosigma* sp. *Thalassiosira mendiolana* sont recensées dans les bassins faiblement et moyennement salés (40 à 90) et coexistent avec les dinoflagellés comme *Gymnodinium* sp., *Peridinium* sp., *Oxyrrhis marina*, *Prorocentrum* sp. *Scripsiella gregaria*, *Protoperidinium* sp. Les Euglénophycées sont faiblement présentes dans ces bassins. Les Chlorophycées sont majoritaires dans les bassins de salinités 180 à 400 avec les espèces *Dunaliella salina* et *Chlamydomonas* sp. Les cyanobactéries sont relativement dominantes dans le bassin M2 (180) en comparaison avec leur abondance enregistrée dans le bassin TS(400) et sont représentées majoritairement par les espèces *Phormidium* sp. et *Aphanotheca* sp. C'est ainsi que le gradient de salinité structure les communautés vivant dans les marais salants de Sfax (Ayadi et al., 2004 ; Abid et al., 2008; Elloumi et al., 2009; Khemakhemet al., 2010). Cependant, d'autres paramètres influencent probablement la répartition des espèces, tels que les concentrations en éléments nutritifs (Abid et al., 2008; Khemakhemet al., 2010), les matières en suspension

(Khemakhemet al., 2010), la distance entre chaque bassin et l'entrée d'eau de mer (Abid et al., 2008).

De plus, les travaux de Toumi et al.(2005); Elloumi et al. (2009); Kobbi-Rebai et al.(2013) et Khemakhemet al.(2010) se sont intéressés aux autres communautés planctoniques. Trente genres de ciliés ont été ainsi identifiés. La plus forte abondance est signalée au niveau des bassins moyennement salés (60 à 90). Les ciliés n'ont jamais été décelés dans les bassins hypersalés (TS 400). Le zooplancton est signalé dans les bassins de salinité comprise entre 45 et 120. Les copépodes sont les organismes dominants du zooplancton peuplant cette saline. Dans les bassins ayant une salinité de 180 (M2) et 320 (B1) respectivement, l'espèce dominante est le crustacé *Artemia salina*.

En conclusion, l'abondance et la diversité du plancton diminuent avec l'augmentation de la concentration en sel et la répartition des copépodes est plus sensible à l'influence de la salinité que le phytoplancton. Seulement, peu d'espèces peuvent survivre aux fortes salinités, la chaîne trophique est alors simplifiée.

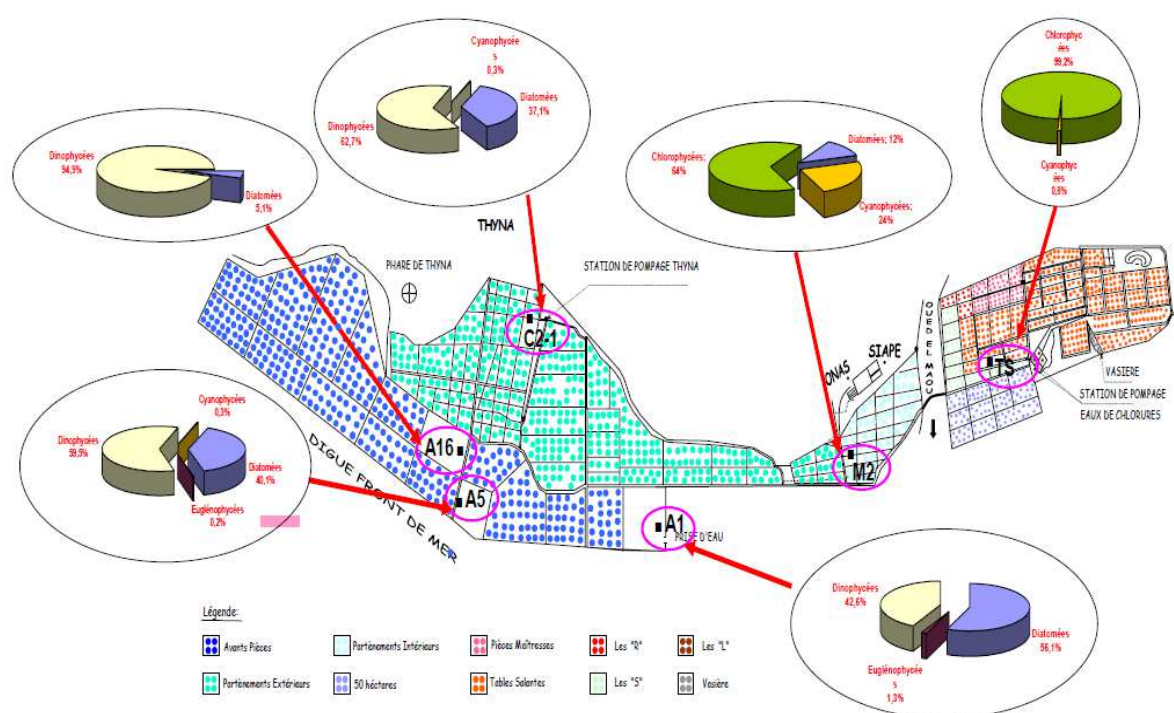


Figure 2. Distribution de l'abondance moyenne du phytoplancton au niveau de la saline de Sfax (Abid, 2009)

3. Le phytoplancton

3.1. Les principaux organismes

Les côtes océaniques sont riches en macro-algues et micro-algues eucaryotes et en cyanobactéries. Les micro-organismes photosynthétiques contribuent à la fixation du carbone dans les zones océaniques. Smetacek (2001) estime qu'ils peuvent fixer des quantités équivalentes de carbone à celles fixées par les forêts. Les océans couvrent plus de 70 % du globe et contribuent à la moitié de la production primaire de la planète (Falciatore et Bowler, 2002). Les diatomées (Bacillariophyta) sont des organismes unicellulaires qui colonisent des milieux aquatiques variés. Les diatomées sont souvent utilisées comme indicateurs de la qualité de l'eau (Van Dam et al., 1994; Potapova et Charles, 2007; Zalack et al., 2010). En raison de leur grande diversité et spécificité d'habitat, elles sont considérées comme le groupe le plus important du phytoplancton eucaryote. En effet, ce groupe assure 40 % de la productivité primaire marine (Falciatore et Bowler, 2002). Elles représentent une source importante de nourriture pour les organismes aquatiques (Debenest et al., 2009). Les micro-algues sont primordiales pour le développement des juvéniles des organismes du niveau trophique supérieur, notamment les larves de poissons. Des perturbations au niveau des communautés de diatomées conduisent indirectement à une perturbation de la productivité de l'ensemble de l'écosystème aquatique (Berard et al., 2003). Elles jouent également un rôle clé dans le cycle biogéochimique de la silice (Treguer et al., 1995) en raison de leur besoin en silicium pour la biogenèse de leur paroi cellulaire. Plus de 250 genres de diatomées et environ 200 000 espèces de différentes tailles et formes ont été décrites (Mann et Droop, 1996). Les diatomées de petite taille (5-50 μm) sont les plus étudiées. Elles sont particulièrement abondantes au début du printemps et à l'automne.

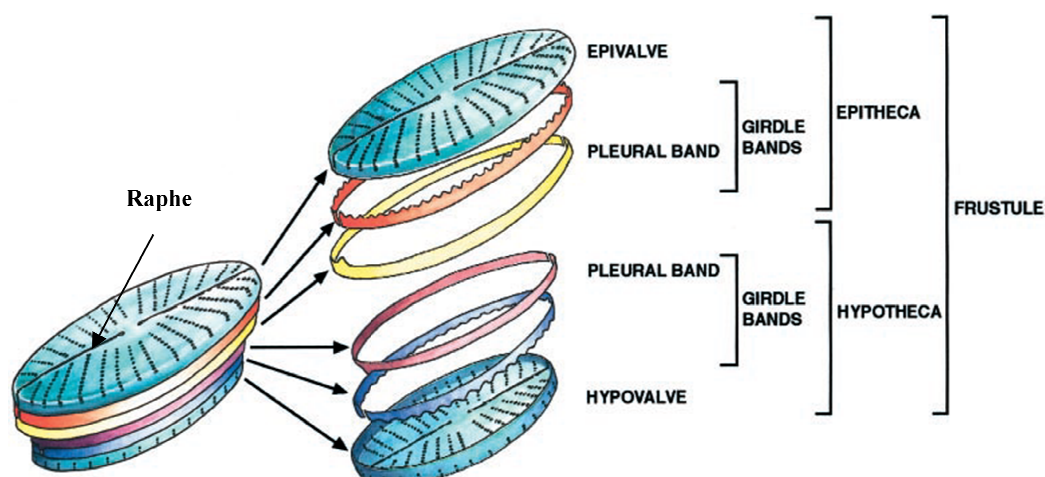


Figure 3. Vue d'ensemble schématique des composants siliceux des parois cellulaires des diatomées. Dessin de Ian Nettleton (Zurzolo et Bowler, 2001).

Pendant les deux saisons indiquées ci-dessus, les nutriments sont abondants dans le milieu où l'intensité lumineuse est optimale pour la photosynthèse. Lorsque les nutriments deviennent limitants, les diatomées s'agglomèrent en agrégats et sédimentent en dehors de la zone photique. Les diatomées de grande taille (2-5 μm) sont ubiquistes dans tous les océans. Leur abondance n'est pas affectée par les variations saisonnières (Falcatore et Bowler, 2002). En plus des formes pélagiques, les diatomées présentent des formes benthiques (Hamsher et al., 2011). Il existe également les diatomées fixées à des macroalgues (les épiphytes). Elles sont signalées dans les mers chaudes et oligotrophes où elles vivent en symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote et des cyanobactéries (Villareal, 1989). Dans ces zones, la fixation de l'azote gazeux par ces endosymbiontes apporte une quantité importante d'azote dans l'écosystème. Ces diatomées sont également recensées dans l'Antarctique et l'Arctique (Falcatore et Bowler, 2002). Malgré leur importance et leur omniprésence dans les océans, peu d'informations étaient disponibles sur leurs caractéristiques moléculaires (Scala et Bowler, 2002), jusqu'au séquençage du génome de *Thalassiosira pseudonana* en 2004 (Armbrust et al., 2004) et celui de *Phaeodactylum tricornutum*, diatomée peu silicifiée en 2008 (Bowler et al., 2008). Leur caractéristique la plus connue était leur capacité à synthétiser une paroi siliceuse ornementée (Alverson, 2008) qui a particulièrement intéressé les

taxonomistes au cours du siècle dernier (Falciatore et Bowler, 2002). Les Bacillariophyta ont la capacité de générer un frustule externe composé de silice amorphe $[(\text{SiO}_2)_n (\text{H}_2\text{O})]$. Ce frustule est constitué d'une épithèque et d'une hypothèque qui s'emboîtent l'une sur l'autre (Fig. 3). Chaque thèque est généralement composée de deux parties: la valve (qui forme la plus grande surface extérieure) et une ceinture (bandes circulaires de silice attachées au bord de la valve). La matière siliceuse du frustule est mise en place par des mécanismes largement étudiés et effectués de façon régulière donnant naissance à une paroi magnifiquement ornementée (Parkinson et Gordon, 1999; Zurzolo et Bowler, 2001; Falciatore et Bowler, 2002; Gordon et Parkinson, 2005). La conception du modèle de reproduction du frustule se produit fidèlement de génération en génération, impliquant ainsi un processus génétique de contrôle strict. La précision de cette architecture nanométrique dépasse ce que peut produire l'industrie des matériaux actuels. La compréhension du processus peut être exploitée dans des applications nanotechnologiques (Mann et Ozin 1996; Morse, 1999; Parkinson et Gordon, 1999; Brott et al., 2001). Les diatomées sont généralement classées en deux grands groupes en fonction de la symétrie de leurs frustules (Van Den Hoek et al., 1997): les diatomées centriques qui sont à symétrie radiale, et les diatomées pennées allongées et à symétrie bilatérale. Certaines des diatomées pennées sont capables de se déplacer, car elles sont dotées de raphé et secrètent un mucilage qui les aide lors de ces déplacements (Edgar et Zavortink, 1983; Kingston, 2009). Les cellules végétatives de diatomées sont diploïdes. Ces cellules peuvent se multiplier végétativement, chaque valve de la cellule mère devenant épithèque de la cellule fille (Zurzolo et Bowler, 2001). Avant la division cellulaire, la cellule s'allonge, dissociant l'épithèque de l'hypothèque, et le noyau se divise par mitose, ensuite le protoplaste se divise en deux par une invagination de la membrane plasmique, et chaque cellule fille doit alors générer une nouvelle hypothèque. Cette dernière est synthétisée par une grande vésicule polarisée, appelée vésicule de dépôt de lasilice (SDV). La biogenèse de l'hypothèque implique la production et le dépôt de la silice de manière précise par son revêtement de matière organique qui empêche sa dissolution. Une fois produite, les deux cellules filles peuvent se séparer (Zurzolo et Bowler, 2001). Les divisions successives des cellules filles et la biogenèse du frustule conduisent à une réduction de la taille des diatomées. Par conséquent, la population diminue en taille au fil du temps. La régénération de la taille originale se produit généralement via la reproduction sexuée, suivie de la formation d'auxospores. La gamétogénèse se produit lorsque la diminution de taille des cellules atteint environ 30- 40% correspondant à la taille critique. Après la méiose, un gamète mâle et un gamète femelle fusionnent pour créer une auxopore (Fig. 4), diploïde plus grande que ces

cellules parentales (Mann, 1993). Cette cellule, nouvellement créée, se reproduira par voie asexuée jusqu'à atteindre de nouveau la taille critique qui déclenchera la gamétogenèse (Fig. 4). Les diatomées centriques se reproduisent par o-ogamies (gamètes de même taille). La seule différence entre les gamètes est la présence de flagelle chez le gamète mâle. Chez les diatomées pennées, les gamètes sont très variés. En effet, on rencontre l'anisogamie, l'isogamie et l'automixis (parthénogenèse). Toutes les études sont basées sur l'observation microscopique. La reproduction sexuée des diatomées est un événement très rare et bref (minutes ou heures) (Falcatore et Bowler, 2002). Certaines espèces ont été suivies pendant un an et ne se sont multipliées que végétativement (Mann, 1993). La reproduction sexuée peut parfois être induite par des conditions défavorables de croissance. Des facteurs tels que la lumière, les nutriments, la salinité et les changements de température (Vaulot et al., 1986) peuvent induire le passage de l'asexualité à la sexuée chez certaines diatomées.

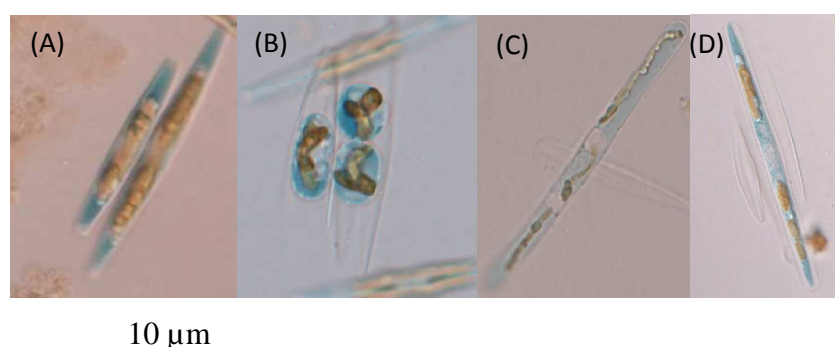


Figure 4. Auxosporulation chez deux clones sexuellement compatibles CCN 148.78 (petite cellule) et de la CCN 320 (cellule plus grande) de *Haslea ostrearia*. A: Couplage des cellules parentales. B: Deux gamètes (à droite) et un zygote (à gauche) à proximité du frustule parental déhiscent. C: une auxospore. D: cellule initiale à l'intérieur de son perizonium (Gastineau, 2011).

Les cyanobactéries, sont des procaryotes photosynthétiques, morphologiquement très divers, qui colonisent de très nombreux biotopes terrestres et aquatiques (Briand et al., 2003; Mankiewicz et al., 2003; Lopes et al., 2012). Des espèces sont adaptées pour vivre dans des

conditions extrêmes telles que celles de l'Antarctique, des eaux géothermales, des lacs salés (Hillary et al., 2009) et même le désert (Hu et al., 2014). La dominance de ces espèces dans plusieurs écosystèmes, indique qu'elles sont dotées de propriétés physiologiques particulières (Walsby et al., 2006). Ces micro-organismes sont une source de métabolites secondaires bioactifs, ayant des activités antivirales (Lopes et al., 2012). En plus, les cyanobactéries, comme *Aphanocapsa* sp., *Anabaena* sp., *Microcoleus* sp., *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp. et *Phormidium* sp., ont la capacité de dégrader les hydrocarbures en conditions aérobies (Kumar et al., 2009). Des cultures de *Spirulina* sp. ont été utilisées pour éliminer les matériaux indésirables tels que les métaux lourds des eaux résiduaires (Chojnacka et al., 2004, 2005), en plus de son utilité dans l'évaluation des tests de toxicité (Deniz et al., 2011). Il est à noter que, les cyanophycées unicellulaires ou filamenteuses se développent en colonies gélatineuses, le mucus abrite une flore bactérienne importante. Il en résulte une certaine difficulté à obtenir des souches axéniques (Roger et Reynaud, 1977). La température de croissance optimale de la plupart des cyanobactéries se situe entre 20 et 25 °C (Robarts et Zohary, 1987). Les cyanobactéries peuvent tolérer des températures plus extrêmes que les micro-algues vertes et les diatomées. Les cyanobactéries présentent une plus grande affinité pour l'azote (N) et le (P) que les autres organismes photo-synthétiques (Msagati et al., 2006). Cette grande affinité leur permet de se développer dans des conditions limitées en (P) et en (N) (Villareal et Carpenter, 2003). Les cyanobactéries ont besoin de sodium pour leur croissance (Apte et Thomas 1980). Les cyanobactéries halotolérantes, comme *Aphanothece halophytica*, peuvent se développer dans une large gamme de salinité allant de 0,25 à 3,0 M de NaCl (Ishitani et al., 1993; Takabe et al., 1988), car elles accumulent des osmoprotectants comme la glycine-bétaïne (Ishitani et al., 1993). Leur multiplication s'effectue principalement par division cellulaire, mais aussi, par sporulation dans certaines conditions (Fritsch, 1904). Des phénomènes de parasexualité ont été observés chez les cyanobactéries, comme la transformation (passage d'un fragment d'ADN d'une cellule vers une autre) et la conjugaison (le transfert d'ADN via un tube étroit). Chez les cyanophytes coccoïde, la reproduction se fait via des structures spécialisées dans des groupes différents (Montejano et Leon-Tejera, 2002). Ces structures spécialisées peuvent concerner par exemple les exocytes (fission binaire asymétrique de la cellule) et les baeocytes (les cellules se divisent à plusieurs reprises, successivement, dans des plans différents, de telle sorte que les cellules résultantes sont plus petites) (fig. 5).

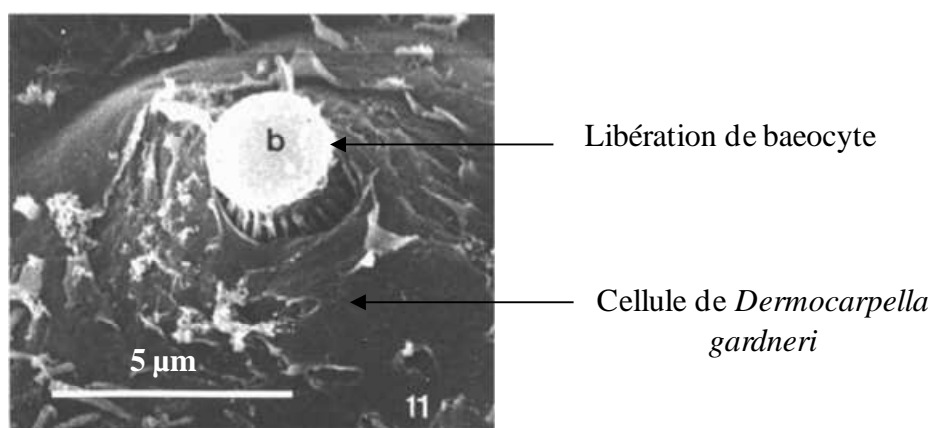


Figure 5. Formation et libération de baeocyte chez la cyanobactérie *Dermocarpella gardneri* (Montejano et Leon-Tejera, 2002)

Dunaliella salina est une microalgue verte unicellulaire et halotolérante, cultivée comme source alimentaire naturelle pour l'aquaculture (Herrmann et al., 1996). Cette espèce constitue souvent le producteur primaire majeur des lacs salés et des salines où elle prolifère à la surface de la colonne d'eau (Oren, 2009). *D. salina* est dépourvue de paroi rigide, contrairement à *Chlamydomonas*, lui permettant de s'adapter à des salinités allant de 50 mM à 5 M de NaCl (Liu et Shen, 2004). Les espèces de *Chlamydomonas*, comme *Chlamydomonas pulsatilla*, possèdent deux à quatre vacuoles contractiles pulsatiles et se développent principalement dans les eaux douces et les milieux de faible salinité et ne présentent pas d'exigence vis à vis du sodium pour la croissance. Seules quelques espèces vivent dans les milieux marins ou salins (Hellebust, 1985). En revanche, la quasi-totalité des espèces de *Dunaliella* vivent dans des milieux salés, allant des eaux marines jusqu'aux lacs salés, à l'exception des espèces d'eau douce (*D. acidophila*, *D. lateralis*, *D. flagellata*, *D. obliqua*, *D. paupera*) possèdent des vacuoles contractiles, contrairement aux espèces marines (*D. maritima*, *D. polymorpha*, *D. primolecta*, *D. quartolecta*, *D. tertiolecta*) et halophiles (*D. parva*, *D. pseudosalina*, *D. salina*, *D. baas-beckingii*, *D. bioculata*, *D. carpatica*, *D. gracilis*, *D. granulata*, *D. media*, *D. minuta*, *D. minutissima*, *D. ruineniana*, *D. terricola*, *D. viridis*) (Borowitzka et Siva, 2007). Ces dernières ne possèdent pas de vacuoles contractiles qui sont nécessaires pour la croissance des cellules sans paroi dans les milieux non salés (Borowitzka et Siva, 2007). Les différentes espèces de *Dunaliella* ont fait l'objet de plusieurs études, car elles sont des modèles de tolérance et de plasticité physiologiques liés à des changements d'intensité lumineuse, de

nutriments et de salinité (Haghjou et al., 2009). Lorsque l'espèce *D. salina* est exposée à de forts éclaircissements elle accumule de grande quantité de β -carotène qui la protège de la photoinhibition (Herrmann et al., 1996). Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'accumulation de β -carotène chez cette microalgue en réponse à différents stress (Ben-Amotz et al., 1989; Jahnke, 1999; Jimenez et Pick, 1993; Salguero et al., 2003). Le β -carotène agit comme anti-oxydant (Krinsky et Yeum, 2003). L'ajustement osmotique est assuré par l'accumulation intra-cellulaire de glycérol, tout en maintenant une faible concentration intra-cellulaire en NaCl (Ben-Amotz et Avron, 1973; Pick et al., 1986). Selon Mishra et al. (2008), *D. salina* accumule d'autres métabolites, comme la glycine-bétaine et la proline qui jouent un rôle majeur dans l'osmorégulation chez cette espèce. *D. salina* se multiplie végétativement ou se reproduit par voie sexuée lorsqu'il y a une réduction de la salinité (Fig. 6). Cette reproduction est hétérothallique et isogamique (Borowitzka et Siva, 2007). La reproduction a lieu entre des cellules (+) et (-), les deux cellules joignent les extrémités de leurs flagelles. Une fois que les flagelles se sont réunis sur toute leur longueur, le gamète (+) produit un mince tube d'accouplement qui le relie avec le gamète (-). Les deux cellules fusionnent. Cette fusion commence à partir de l'extrémité antérieure conduisant à la formation d'un planozygote avec quatre flagelles (Oren, 2005). *Dunaliella* peut produire des kystes végétatifs (aplanospores) à une faible salinité (Margulis et al., 1980). Les aplanospores ont deux parois épaisses extrêmement résistantes (Borowitzka et Siva, 2007). Ces auteurs signalent également la formation d'aplanospores dans les cultures âgées carencées en éléments nutritifs. Lorsque les cellules sont exposées à des conditions extrêmes, comme une augmentation et/ou une diminution de la salinité, les cellules de *Dunaliella* s'agglomèrent en amas formant ainsi le stade palmella (Borowitzka et Siva, 2007).

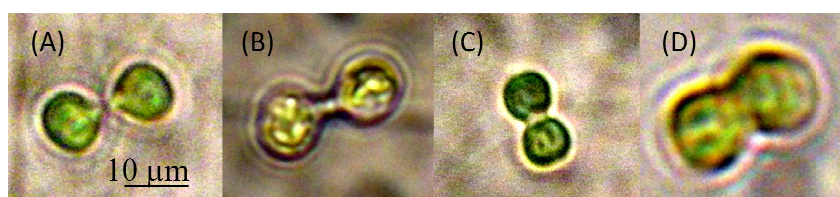


Figure 6. Les différents stades de la reproduction sexuée chez *D. salina*: Fusion (A), (B), (C)
(D)

3.2. Identification moléculaire des espèces

L'identification correcte des micro-algues en microscopie optique est difficile à cause de leur taille microscopique. Le recours à la microscopie électronique à balayage est souvent nécessaire pour identifier certaines espèces. Parfois, l'identification des algues reste difficile car elles sont fragiles : elles ne survivent pas à la collecte, aussi la fixation rétracte les thalles et modifie la pigmentation et les flagelles (Holm et Godhe, 1995). L'identification classique en microscopie optique est habituellement utilisée pour les cyanobactéries (Caudales et Wells, 1992; Lyra et al., 1997). L'inconvénient majeur pour identifier ces organismes étant les variations phénotypiques sous l'influence des différentes conditions de culture. Par conséquent, les approches biomoléculaires pour étudier la diversité des cyanobactéries constituent actuellement la meilleure alternative (Wilson et al., 2000). L'avènement des techniques de biologie moléculaire a considérablement amélioré la capacité à discriminer les micro-organismes (Pramateftaki et al., 2000), y compris le phytoplancton (Medlin et al., 1999), et a révisé certaines classifications basées sur des caractères morphologiques et ultrastructuraux (Caisová, 2011). Selon Holm et Godhe (1995), sans que le génome soit complètement séquencé pour chaque organisme, l'analyse de gènes conservés s'est avérée un outil très utile dans la clarification des relations entre les algues. Cela a conduit à l'ajout de nouvelles données et par la suite une révision de l'ancienne classification des micro-algues. Ainsi une nouvelle science a vu le jour : la phylogénie.

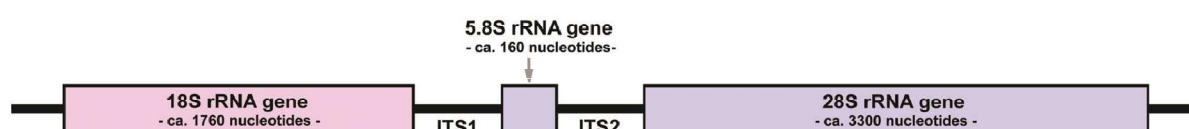


Figure 7. Schéma des gènes de l'ARNr ribosomique eucaryote 18S; 5,8 S et 28S (Coleman, 2003, modifié)

Selon Watanabe et al., 1996; Coleman, 2009; Del Campo et al., 2010; Marin et Melkonian, 2010, les régions de l'ADN les plus couramment analysées à des fins taxonomiques sont les gènes de l'ARN ribosomal (18S ARNr, 5,8 S et 28 S ARNr) et les espaceurs ITS (Espaceur Interne transcrit) (Fig. 7), le gène mitochondrial (coxI), les gènes chloroplastiques (rbcL, atpB) et les gènes de l'actine. Les ARN ribosomiques sont particulièrement utiles pour l'analyse comparative des organismes et les études évolutives à

des niveaux taxonomiques supérieurs (par exemple famille, ordre, classe) (Caisová, 2011). Ils sont lentement modifiés car ils présentent les principaux éléments de la machinerie de la synthèse protéique des cellules (Holm et Godhe, 1995). La petite sous unité de l'ARNr (ARNr SSU) est plus conservée que la grande (ARNr LSU). Il est donc plus utile d'utiliser la petite sous unité pour analyser les espèces les plus lointaines. Selon Ouvrard et al. (2000), Meyer et al. (2010), l'ARNr SSU est le marqueur le plus fréquemment utilisé. L'analyse du gène LSUrRNA a été très utilisé pour discriminer des espèces étroitement apparentées, comme les groupes d'espèces et les clones de différentes origines géographiques (Holm et Godhe, 1995). Diverses études indiquent que l'ARN ribosomique est devenu l'outil le plus fréquent utilisé dans la phylogénie des micro-algues (Olmos et al., 2009; Gontcharov et al., 2004; Amini et al., 2009; Moro et al., 2009). Plusieurs études ont également évalué l'utilité de l'ARNr 28S comme marqueur potentiel pour l'identification taxonomique (Medina et al., 2001, Sonnenberg et al., 2007).

Les gènes les plus utilisés comme marqueurs pour déterminer les cyanobactéries sont les gènes ribosomiques 23S (Caisová, 2011) et 16S, en raison de leur omniprésence chez les procaryotes (Wilson et al., 2000). Selon Palenik et Haselkorn (1992), le gène de la polymérase rpoC1 (The core RNA polymerase ou DNA-directed RNA polymerase subunit gamma) est plus discriminatoire que le gène 16S puisqu'il existe en un seul exemplaire dans le génome des cyanobactéries (Bergsland et Haselkorn, 1991).

L'étude de la diversité génétique chez les micro-organismes marins pélagiques est pratiquement inexistante. Il est évident que les populations géographiquement isolées et qui ont des capacités de dispersion élevées ne sont pas obligatoirement génétiquement homogènes. À l'heure actuelle, la plupart des études génétiques s'appuient sur des cultures monoclonales pour leurs analyses. L'isolement de cellules, à partir de populations naturelles qui sont ensuite cultivées pour obtenir des cultures monoclonales, ne reflète pas la diversité des espèces. La survie sélective de seulement 10 à 30 % des clones, provenant de populations naturelles, peut signifier que la diversité du matériel génétique, déterminée à partir d'une banque de clones est capable de minimiser la diversité génétique dans la population d'origine. La biologie et le cycle de vie de nombreuses micro-algues en culture sont incomplets, et si celles-ci se reproduisent pendant la culture, cela peut aussi affecter la performance des analyses génétiques (Holm et Godhe 1995). Les connaissances limitées de la diversité génétique du phytoplancton proviennent de la difficulté à trouver des marqueurs polymorphes pour les études génétiques et écologiques. Les marqueurs génétiques utilisés dans les

premières études évoluent si lentement que les populations relativement proches semblent identiques. De ce fait, l'hypothèse d'absence de diversité génétique, phytoplanctonique en milieu marin, a été fortement soutenue. L'utilisation de techniques plus résolutive, comme la technique des empreintes génétiques « sensu lato », des marqueurs génétiques de type multiou singlelocus (Holm et Godhe, 1995) dépasse les handicaps signalés ci-dessus et ouvre de nouvelles perspectives de recherche sur la diversité génétique (Medlin et al., 1999).

Des techniques de PCR ont été mises au point pour l'identification spécifique de micro-algues à partir d'échantillons environnementaux (Moro et al., 2009), avec l'utilisation d'amorces ciblées aux espèces phytoplanctoniques de faibles fréquences. Dans ce contexte, *Dinophysis acuminata* a pu être détecté dans des échantillons naturels par des PCR spécifiques à des concentrations inférieures à 30 cellules L⁻¹. La présence d'*Alexandrium tamarense* dans l'eau de mer filtrée a pu être détectée avec des cellules en culture. La concentration d'ADN utilisé comme matrice de PCR est égale à 210⁻¹³ g µL⁻¹. Les amorces spécifiques et les sondes radioactives utilisées chez *Alexandrium* spp. ont pu détecter *A. lusitanicum* à une concentration d'ADN de 1,5 10⁻¹⁵ g µL⁻¹, correspondant à 100 cellules. Une PCR a pu être réalisée afin de détecter l'espèce *A. minutum* à partir d'un faible échantillon ne comportant que 0,3 cellules L⁻¹. Ces résultats montrent que la PCR peut être une méthode spécifique et très sensible pour la détection de microalgues dans des échantillons d'eau naturelle (Holm et Godhe, 1995).

L'information moléculaire peut aussi être utilisée pour évaluer l'expression différentielle des gènes dans les milieux naturels. En analysant l'ARN_m du gène *rbcL* avec des sondes obtenues à partir de la diatomée *Cylindrotheca* sp. et une cyanobactérie *Synechococcus* sp. Holm et Godhe (1995) ont pu montrer que, dans le lac Erié, l'expression du gène *rbcL* des diatomées semble diminuer à partir de la rive jusqu'en profondeur et que l'expression de ce gène chez les cyanobactéries ne suit pas cette tendance. Après transcription inverse de l'ARN_m *rbcL*, les différentes séquences d'ADNc obtenues ont été amplifiées par PCR et séquencées. Les séquences des échantillons près de la surface étaient différentes de celles des échantillons proches du sédiment, ce qui suggère qu'il y avait une stratification des organismes photosynthétique.

4. Principaux mécanismes de défense contre le stress salin chez les microalgues et les cyanobactéries

Une augmentation de concentration en NaCl, chez les cyanobactéries, engendre une perte d'eau due au stress osmotique (Poolman et Glaasker, 1998). Les concentrations externes élevées en ions inorganiques, notammenten Na^+ et en Cl^- , conduisent à un stress ionique (Karandashova et Elanskaya, 2005). L'ajustement osmotique est réalisé par l'absorption d'ions inorganiques et par la synthèse d'osmotocums. L'eau pénètre dans les cellules par les aquaporines (Jang et al., 2004). À des concentrations élevées, les ions inorganiques sont toxiques pour la cellule et déstabilisent le métabolisme cellulaire (Karandashova et Elanskaya, 2005). Les expositions au stress osmotique et au stress salin sont souvent considérées comme identiques; cette considération n'a pas été vérifiée. Le stress osmotique expulse rapidement l'eau du cytoplasme; en conséquence, le volume du cytoplasme diminue et la concentration d'ions dans la cellule augmente. Le stress salin réduit initialement le volume du cytoplasme (Mackay et Norton, 1987) puis il est suivi par une augmentation rapide de la concentration intra-cellulaire en Na^+ et Cl^- (Allakhverdiev et al., 1999) via les canaux ioniques.

Pour s'acclimater aux contraintes de l'environnement, les cellules doivent percevoir le stress et ensuite le traduire (Shoumskaya et al., 2005). La réponse physiologique est déclenchée en aval d'une induction de plusieurs gènes impliqués dans l'adaptation au sel (Karandashova et Elanskaya, 2005). L'étude de Novikova et al.(2007) a révélé que chez *Synechocystis* sp., les protéines de type « Hik » sont impliquées dans la perception et la transmission des signaux de stress dû au froid (Suzuki et al., 2001), à l'osmolarité élevée (Mikami et al., 2002; Paithoonrangarid et al., 2004) et à des concentrations élevées de NaCl (Marin et al., 2003).

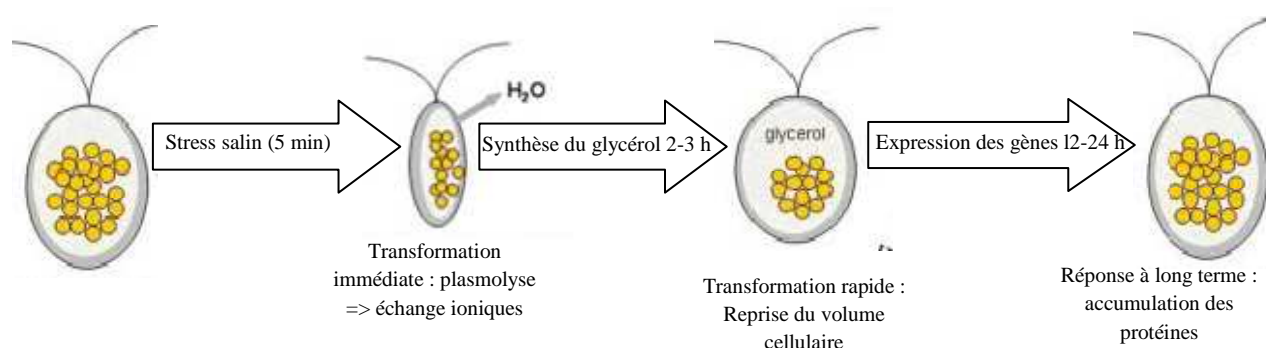


Figure 8. Principales étapes de la réponse de *Dunaliella salina* à un stress salin (Chen et Jiang, 2009).

La réponse des cyanobactéries (Karandashova et Elanskaya, 2005) et la Chlorophycée *Dunaliella salina* (Chen et Jiang, 2009) à un stress salin comprend trois phases principales (Fig. 8). Au cours de la première phase, les ions Na^+ et Cl^- pénètrent rapidement (en quelques secondes) dans le cytoplasme. La turgescence diminue fortement en raison d'une augmentation de la concentration en NaCl de l'environnement. Cette réponse est immédiate, elle commence dès les 5 premières minutes d'exposition au stress. *Dunaliella* peut changer son volume en quelques secondes si elle est soumise à un stress osmotique. Des coupes minces de la membrane plasmique, observées au microscope électronique, montrent que la plasticité de la membrane plasmique est le résultat de la fusion de plusieurs petites vésicules (0,25 μm de diamètre) provenant du cytoplasme (Maeda et Thompson, 1986). Cette observation indique que *D. salina* possède de un réservoir de membrane lui permettant d'augmenter ou de diminuer rapidement son volume cellulaire. Ainsi la cellule est protégée de l'apoptose et de l'éclatement. Dans la deuxième phase, qui dure environ 1 h, les cellules rejettent les ions Na^+ et absorbent du K^+ , ce qui évite que le sodium atteigne une concentration toxique (Iyer et al., 1994; Torrecilla et al., 2001). Dans la troisième phase, qui dure plusieurs heures (2 à 3 heures chez *Dunaliella salina*), la synthèse d'osmoprotectants (Reed et Stewart, 1985; Warr et al., 1985; Erdmann et al., 1992; Hagemann et Erdmann, 1997; Allakhverdiev et al., 1999) tend à ajuster la pression osmotique par rapport à l'extérieur de la cellule (Iyer et al., 1994; Torrecilla et al., 2001). La fin de cette étape est marquée par la reprise du volume cellulaire. Si on prend l'exemple de *Dunaliella* qui est dépourvue de paroi cellulaire, les cellules diminuent rapidement de volume suite à un choc osmotique (stress salin) suivi par la synthèse de proline, de glycine-bétaine et de glycérol (Mishra et al., 2008). Ces osmolytes augmentent l'osmolarité intercellulaire jusqu'à ce que la cellule reprenne son volume initial (Chen et Jiang, 2009, Fig. 8). Chez les cyanobactéries, la synthèse des osmolytes dépend de leur capacité à tolérer le sel (Mackay et al., 1984; Kempf et Bremer, 1998; Waditee et al., 2002). Les espèces, présentant une faible tolérance au sel (jusqu'à 0,7 M NaCl), accumulent du saccharose et du tréhalose. Les espèces, comme *Synechocystis* sp. PCC 6803 ayant une tolérance modérée au sel (jusqu'à 1,8 M de NaCl), accumulent du glycosylglycérol (Erdmann et al., 1992). Les espèces tolérant une forte concentration en sel (jusqu'à 2,7 M de NaCl), tels que *Synechococcus* sp. PCC 7418 et *Aphanothece halophytica* (Allakhverdiev et al., 2001), accumulent de la glycine-bétaine ou de la bétaine-glutamate. Il est à noter que chez les cyanobactéries, les disaccharides sont synthétisés plus rapidement que le glycosylglycérol. Par conséquent, les souches accumulant les disaccharides s'acclimatent plus rapidement aux changement de salinité que celles synthétisant du glycosylglycérol (Reed et Stewart, 1985).

Les changements au niveau de l'expression des gènes reflètent les processus physiologiques qui se déclenchent dans la cellule 12 à 24 h (Fig. 8) suite à un stress salin (Karandashova et Elanskaya, 2005; Chen et Jiang, 2009). Chacune des trois phases physiologiques est nécessaire pour l'adaptation des cyanobactéries et des microalgues au stress salin. Cette réponse est à la fois l'expression des gènes induits par le stress et une accumulation des protéines correspondantes (Karandashova et Elanskaya, 2005).

La régulation de l'expression génique est le principal mécanisme d'adaptation aux conditions environnementales changeantes. Trois groupes différents de protéines, selon la réponse à des changements des conditions environnementales, sont identifiés chez les cyanobactéries exposées à un stress osmotique : les protéines dont l'expression est indépendante des conditions environnementales, les protéines dont la synthèse est supprimée ou annulée en réponse à des changements des conditions environnementales, et les protéines dont l'expression est induite et augmentée dans des conditions environnementales défavorables (Hagemann et al., 1994; Hagemann et Erdann, 1997; Fulda et al., 2000). Le dernier groupe correspond aux protéines de stress parce qu'elles sont synthétisées quelques heures après le stress salin (Apte et Bhagwat, 1989), alors que la synthèse de la plupart des autres protéines est inhibée (Hagemann et al., 1990). Certaines protéines de stress sont synthétisées pendant une courte période (Apte et Bhagwat, 1989). Selon Joset et al. (1996), ces protéines déclenchent la réponse au stress salin. Environ 10% du génome sont régulés par des changements environnementaux comme la salinité chez *Anabaena torulosa* (Apte et Haselkorn, 1990). Selon Fernandes et al. (1993), les protéines induites par le sel ne sont pas celles induites par le stress osmotique. En effet les espèces résistantes au sel peuvent être sensibles au stress osmotiques et vice-versa. Chez *Synechocystis* 7942, le stress salin active les gènes codant les sous unités ATP (Alge et Peschek, 1993; Karandashova et Elanskaya, 2005). Chez *Synechocystis* 6311, le stress salin active 15 à 50% des gènes codant les antiports Na^+/H^+ (Blumwald et al., 1984; Karandashova et Elanskaya, 2005) et induit la sur-expression de ces antiports chez *Synechococcus* sp.7942 (Waditee et al., 2002). L'activité de la cytochrome-oxydase dans la membrane plasmique chez *Anacystis nidulans* augmente immédiatement après un choc salin et devient trois fois plus élevée que le niveau initial après 4 jours d'acclimatation (Molitor et al., 1986).

Selon Karandashova et al., 2002, le stress salin induit l'expression d'environ 360 gènes chez *Synechocystis* 6803. Cet ensemble comprend les gènes codant pour des enzymes de

biosynthèse de glycosylglycérol, lessous-unités des transporteurs de K^+ (KtrAB) (Berry et al., 2003a), et plusieurs protéines de fonction inconnue.

4.1. La photosynthèse

La photosynthèse oxygénique est le processus par lequel des organismes convertissent l'énergie solaire en énergie chimique (Fig. 9). Ce mécanisme maintient la vie sur Terre. Les micro-algues et les cyanobactéries possèdent des thylakoïdes pourvus d'antennes collectrices de la lumière. Ces antennes diffèrent selon les espèces (Fig. 10). En effet, il existe 3 principaux types d'antennes: (i) les antennes qui sont riches en phycobiliprotéines chez les Rhodophytes et les cyanobactéries (Zuber, 1986, Fig. 10B), (ii) les antennes (appelées LHC : Light Harvesting Complex) qui sont constituées de protéines associées aux Chl *a* et *b* et aux xanthophylles (principalement la lutéine) chez les Chlorophytes (plantes, algues et micro-algues vertes; Maxwell et al., 1995, Fig. 10A) et (iii) les antennes qui renferment les xanthophylles comme la fucoxanthine, la péridinine et diadinoxanthine avec les Chl *a* et *c* chez les Chromophytes (exemple : Diatomées) (Passaquet et al., 1991). Les phycobilisomes sont constituées d'une apoprotéine et d'un chromophore qui est une biline lié d'une manière covalente à l'apoprotéine. La chlorophylle est un chlorine (quatre noyau pyrroles en cercle), chélatant un atome de magnésium au centre, ainsi qu'un alcool à longue chaîne, le phytol (sauf pour la Chl *c*). Les caroténoïdes (les carotènes et les xanthophylles) sont des pigments plutôt orange et jaune appartenant à la famille chimique des terpénoïdes, formées à partir de la polymérisation d'unités isoprènes à structure aliphatique ou alicyclique.

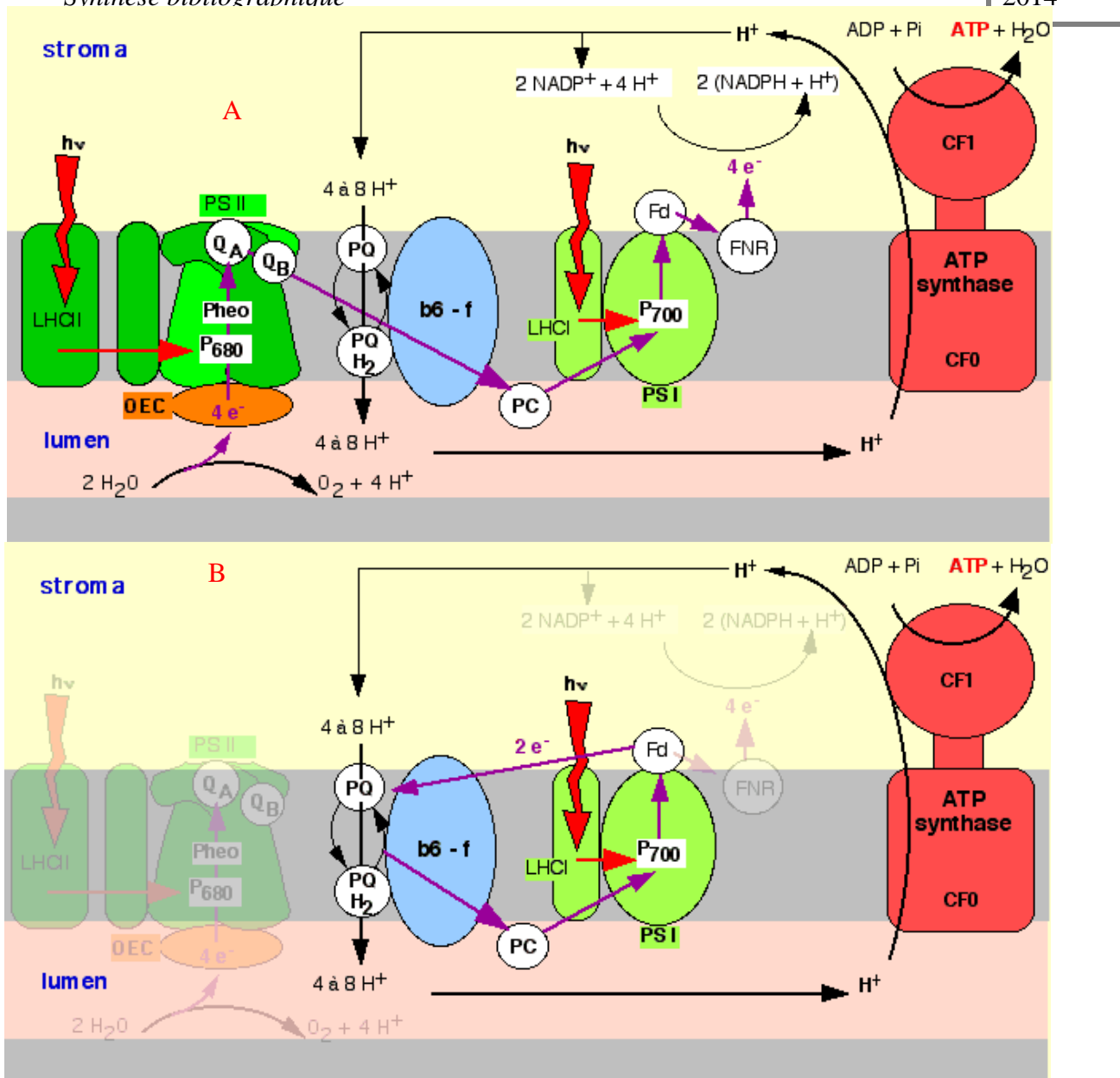


Figure 9. Schéma de la photosynthèse au niveau d'un thylacoïde. A: transfert acyclique des électrons, B: transfert cyclique des électrons,

(<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Photosynthese-cours/>). Abréviations : OEC: Oxygen Evolving Complex, LHCI et II: antenne du PSI et PSII, Pheo : phéophytine; Q: Quinones, PQ/PQH₂: plastoquinone oxydée / réduite, Cytb6-f: complexe des cytochromes, PC: plastocyanine, FD: ferredoxine, FNR: Ferredoxine NADP Réductase, PS I et PS II : photosystèmes I et II, P680 et P700: centre réactionnel du photosystème II et du photosystème I

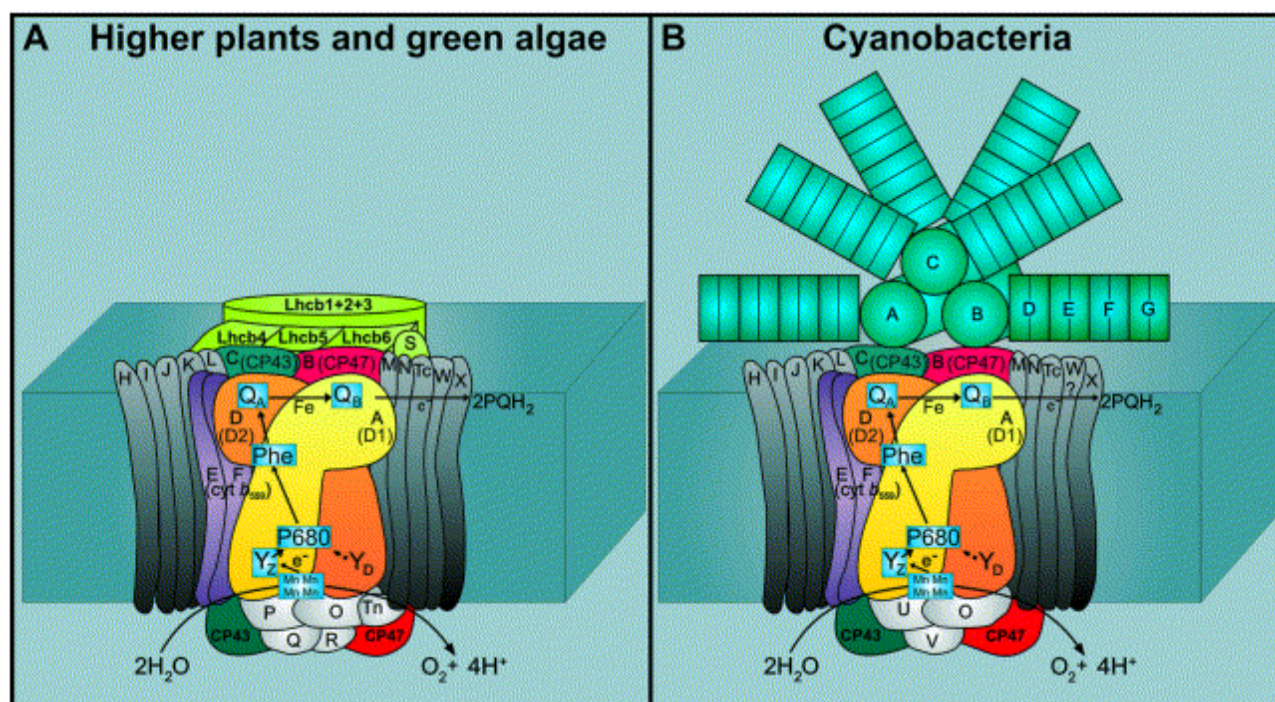


Figure 10. Schéma de l'organisation des antennes collectrices du photosystème II dans la membrane des thylakoïdes des plantes et des micro-algues (A), des cyanobactéries et des Rhodophytes (B). (<http://photoscience.la.asu.edu/photosyn/photoweb/>). Abréviations : Cyt, cytochrome; Phéo, Phéophytine; Lhc, antenne collectrice de la lumière; PQH₂, plastoquinone; P680, centre réactionnel du PS II; Q_A et Q_B, quinones A et B

Lors de la photosynthèse oxygénique, le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII) fonctionnent en série dans la membrane thylakoïdale et possèdent des propriétés d'absorption lumineuse différentes (Anderson, 1999). L'irradiance incidente est absorbée par les antennes collectrices associées aux centres réactionnels des PSII et PSI. Cependant, lorsque l'irradiance est élevée, l'appareil photosynthétique génère de l'oxygène singulet qui cause des dommages au PSII d'où le phénomène de photo-oxydation (Vass et al., 1992; Melis, 1999). Celle-ci altère la fonction de la protéine D1 (32kD) du centre réactionnel PSII, ce qui réduit l'intensité de la photosynthèse et par conséquent diminue la croissance (Powles et Critchley, 1980; Jin et al., 2003). La lumière induit la phosphorylation du LHCII (complexe pigments-protéines collecteur de lumière ou « light harvesting complex ») grâce à l'activation de la STN7 kinase (Sérine/thréonine protéine kinase, Rochaix, 2007; Zer et al., 1999). Les résultats de Liu et Shen (2004) ont montré que le NaCl peut également induire la phosphorylation du LHCII, que se soit à l'obscurité ou à la lumière, chez *D. salina*. Le NaCl

agit en synergie avec la lumière et stimule l'activation de la protéine kinase induisant des changements conformationnels au niveau du LHCII (Liu et Shen, 2004).

Lors de changements du niveau d'éclairement, la phosphorylation réversible suite à la capture de la lumière par les complexes Chl *a*, *b* / protéines de liaison (LHCII) permet d'équilibrer l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes (Allen, 1992). Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, algue verte d'eau douce, la phosphorylation du LHCII est accompagnée par la migration du complexe cytochrome *b6f* du PSII au PSI augmentant ainsi le flux d'électrons cyclique et la formation d'ATP (Fig. 9B) (Wollman, 2001; Rochaix, 2002). Chez *C. reinhardtii*, l'ajout d'un découpleur induit l'inhibition de la synthèse d'ATP associée à la phosphorylation du LHCII (Rochaix, 2002; Wollman, 2001; Bulté et al., 1990). Chez *D. salina*, l'ajout de NaCl et d'autres sels induit également la phosphorylation du LHCII (Liu et Shen, 2004). Des études antérieures ont montré que NaCl exerce un effet inhibiteur sur l'activité de la membrane thylakoïdale, l'ATPase et les enzymes solubles chez *Dunaliella* (Borowitzka et Brown, 1974; Finel et al., 1984). Les cellules de *Dunaliella* maintiennent de faibles concentrations intracellulaires en sel, grâce à la synthèse importante de glycérol qui assure l'ajustement osmotique (Ben-Amotz et Avron, 1973; Pick et al., 1986; Ehrenfeld et Cousin, 1984).

En conclusion, un choc salin entraîne chez *D. salina* une diminution de la synthèse d'ATP (Bental et al., 1990) et induit la phosphorylation de LHCII. En conséquent, un état de transition se crée entre le PSI et le PSII favorisant la synthèse d'ATP qui sera utilisé pour la synthèse de glycérol et l'extrusion du Na⁺ (Gilmour et al., 1985). Cette réaction transitoire améliore le flux d'électrons cyclique dans les conditions de stress salin (Gilmour et al., 1985) qui a été mis en évidence par un suivi de l'évolution de la fluorescence de la chlorophylle.

phycobilisomes, du PSI et du PSII. Par ailleurs, le stress salin active l'expression du gène *slr1390* et *slr1604* codant pour les métalloprotéases (FTSH), qui sont impliquées dans la protéolyse des protéines D1 du PSII endommagées par la lumière (Karandashova et Elanskaya, 2005).

Lorsque les cellules de *Synechocystis* sp. PCC 6803 sont adaptées au sel, le rapport PSI / PSII augmente (Schubert et Hagemann, 1990). Cela peut être dû à une augmentation de l'activité du PSI ou à une augmentation du nombre de PSI (Jeanjean et al., 1993).

Le stress salin est associé à un rôle plus important du transport cyclique des électrons qui produit de l'ATP pouvant servir à l'efflux d'ions (Jeanjean et al., 1998). La ferrédoxine FNR joue un rôle dans le transport cyclique des électrons, le gène *Peth* qui la code est induit par le stress salin (Van Thor et al., 1998). Le stress salin induit également l'inactivation, rapide mais réversible, de la machinerie photosynthétique et plus particulièrement du PSII (Allakhverdiev et al., 2001). Il en résulte la formation d'oxygène singulé chez les organismes phototrophes, y compris les cyanobactéries. Chez *Synechococcus* sp. (PCC 7942), l'influx de Na^+ via des canaux ioniques, est déclenché à une salinité supérieure à 0,5 M, causant des dommages à l'appareil photosynthétique (Allakhverdiev et al., 2000b). Chez *Synechococcus* sp. PCC 7942 mis en présence de NaCl 0,5 M la réduction de P700 est inhibée et l'association plastocyanine - PSI est dénaturée (Allakhverdiev et al., 2001). Lorsque les cellules de *Synechococcus* sont incubées à long terme (plus de 5h), les PSII et PSI sont inactivés. Cette inactivation est due à la destruction du noyau Mn impliqué dans la photolyse de l'eau et le dégagement de O_2 et à l'inactivation du complexe PSII (Stewart et al., 1985; Shen et al., 1992; Allakhverdiev et al., 2000b). Selon Allakhverdiev et al. (2000b), chez *Synechococcus* le NaCl n'endommage pas la QA, la phéophytine et P680, mais plutôt bloque le transport des électrons à partir de l'eau vers P680. Cette constatation est soutenue par les travaux de Yamashita et Butler (1969). En effet, l'incubation des membranes thylakoïdales dans le sel inhibe aussi le transport d'électrons de l'eau jusqu'à P680 qui a pour conséquence l'inhibition du dégagement de O_2 (Miyao et Murata, 1983; Murata et Miyao, 1985).

Allakhverdiev et al. (2002) montrent les effets du NaCl sur la reprise de l'activité PSII après que les cellules de *Synechocystis* sp. (PCC 6803) aient été exposées à un fort éclaircissement ($2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pendant 100 min, un traitement qui réduit l'activité du PSII à environ 10% de son niveau initial. Pour suivre le rétablissement du PSII, les cellules ont été exposées à une intensité lumineuse de l'ordre de $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant 4 h, en présence de différentes concentrations en NaCl (20 mM; 0,5 M et 1 M). En présence de 20 mM de NaCl, l'activité du PSII atteint 90 % de la valeur initiale dans les 2 h qui suivent, et la reprise est complète

enmoins de 3 h. Lorsque les cellules sont incubées avec 0,5 M de NaCl, la reprise est lente et seulement 60 % de l'activité initiale est retrouvée après 4 h. Enfin, en présence de NaCl 1M, aucune reprise n'a été observée. Ces résultats montrent que le NaCl à des concentrations élevées inhibe la réparation du PSII et pourrait expliquer la capacité apparente du NaCl à accélérer les dommages au PSII induite par la lumière.

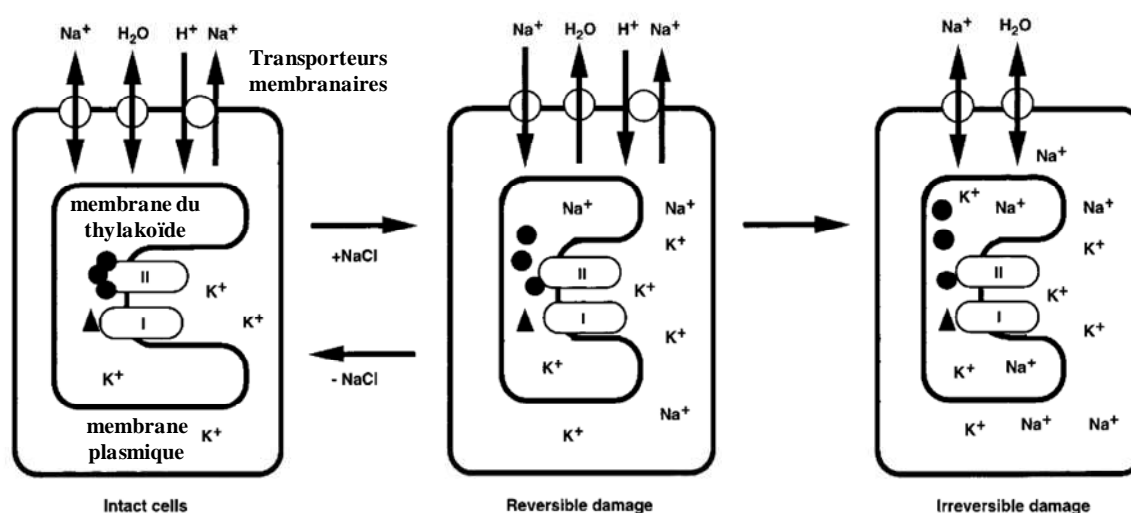


Figure 12. Modèle hypothétique expliquant l'inactivation de l'appareil photosynthétique induit par le NaCl chez *Synechococcus* sp (Allakhverdiev et al., 2000a). I:PSI, II:PSII, les cercles noirs:protéines extrinsèques à savoir la protéine de 33 kDa, cytochrome c550, et PsbU; le triangle noir:protéine associée au PSI, à savoir, la plastocyanine ou cytochrome c553.

Un modèle permettant d'expliquer l'inactivation de l'appareil photosynthétique, induit par l'NaCl, a été proposé par Allakhverdiev et al. (2000a) (Fig.12). Les canaux Na^+ et K^+ et les aquaporines localisés dans la membrane plasmique et la machinerie photosynthétique est située du côté du lumen dans les membranes des thylakoïdes. Chez les cyanobactéries, cette machine est stabilisée par trois protéines extrinsèques: une protéine de 33 kD, le cytochrome c550, et PsbU (extrinsic protein of the photosystem II complex) (Nishiyama et al., 1999). Le cytochrome c550 et PsbU sont intimement liés au complexe PSII (Nishiyama et al., 1999). Ces protéines se dissocient facilement du complexe PSII chez les cyanobactéries en présence de fortes concentrations de sels (1 à 2 M de NaCl) (Stewart et al., 1985; Shen et al., 1992). Lorsque les concentrations extracellulaires en Na^+ augmente, 25 % de l'eau intracellulaire sortent de la cellule via les aquaporines et les ions Na^+ entrent dans le cytoplasme. L'antiport

Na^+/H^+ expulse le sodium hors de la cellule maintenant ainsi une concentration faible en Na^+ dans le cytosol. Mais cet antiport devient inopérant suite à une incubation prolongée (plus de 6h) avec du NaCl et en conséquence, la concentration cytosolique en Na^+ augmente. Ensuite, le Na^+ traverse la membrane du thylakoïde et sa concentration augmente dans le lumen. En conséquence, les protéines extrinsèques se dissocient du PSII et l'activité photosynthétique est partiellement inactivée. Le même phénomène se produirait au niveau du PSI. L'augmentation intrathylakoïdale de la teneur en Na^+ pourrait conduire à une dissociation de la plastocyanine ou du cytochrome c553 du PSI causant une diminution du taux de transport des électrons (Fig. 12). L'insaturation des acides gras transmembranaires stimule la synthèse et le fonctionnement des antiports Na^+/H^+ et les H^+ -ATPases en améliorant la fluidité des membranes (Allakhverdiev et al., 2001). Lorsque ces transporteurs sont abondants, la concentration cytosolique en Na^+ diminue, levant l'inhibition de l'activité du PSII et du PSI (Allakhverdiev et al., 2001). En conséquence, l'activité du PSII et du PSI sera préservée.

Le stress lumineux et le stress salin sont deux facteurs environnementaux qui limitent l'efficacité de la photosynthèse. Dans les salines, il se produit très souvent une combinaison entre le stress salin et le stress lumineux. Plusieurs études sur les effets du stress salin sur le PSII combiné au stress lumineux ont été publiées (Murata et al. 2007). Le stress salin renforce l'effet d'inhibition de la lumière sur le PSII chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Neale et Melis, 1989) et chez *Spirulina platensis* (Luet Zhang, 1999). Selon Allakhverdiev et al. (2002), il existe un effet de synergie entre les stress lumineux et salin inactivant le PSII. Des études antérieures de l'appareil photosynthétique *in vivo* ont montré que le stress salin augmente l'inactivation du PSII induite par la lumière (Neale et Melis, 1989; Lu et Zhang, 1999). Allakhverdiev et al. (2002) ont confirmé les effets synergiques négatifs du stress lumineux et du stress salin sur le PSII chez *Synechocystis* sp. PCC 6803. Cependant, les effets séparés de la lumière et du stress salin sur le PSII sont différents. Le stress salin inhibe la réparation de la photo-inhibition du PSII mais ne l'endommage pas directement. Selon Allakhverdiev et al. (2002), les protéines marquées *in vivo* par la méthionine [^{35}S]Met révèlent que le stress salin inhibe la synthèse des protéines, en particulier la protéine D1. Les techniques de northern blot and western blot ont montré que le stress salin inhibe la transcription et la traduction des gènes *psbA* qui codent la protéine D1. Ainsi, le stress salin inhibe la réparation du PSII par la suppression des activités de transcription.

4.2. Le système anti-oxydant

Le métabolisme primaire des organismes aérobies génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en faible quantité. Leur production est augmentée par les stress environnementaux comme la salinité (Rijstenbil, 2005; Choo et al., 2004 ; Zhu, 2002 ; Kûpper et al., 2001). Les ROS englobent des molécules telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les radicaux comme le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et l'anion superoxyde ($\cdot O_2$). Les ROS sont formées par photolysede l'eau au cours de la photosynthèse qui génère les radicaux hydroxyl et hydrogène ($\cdot OH$ et $\cdot H$, respectivement). L'hydrogène réagit avec les radicaux oxygène pour produire le perhydroxyle. Les ROS sont également formés au cours de la respiration cellulaire par fuite d'électrons de la chaîne respiratoire et la réduction de l'oxygène en anion superoxyde. En outre, les ROS sont aussi des dérivés de l'activité photosynthétique oxygénique lors du transport des électrons dans les thylacoïdes (Moller, 2001). Les ROS sont des oxydants forts et sont considérés comme cytotoxiques, puisque ils causent des dommages à l'ADN et la peroxydation lipidique (Rijstenbil, 2005). Les organismes aérobies, comme les micro-algues ont développé des mécanismes de défense contre l'accumulation de ROS (Tsao et Deng, 2004). Ces mécanismes comprennent des enzymes anti-oxydantes (Super Oxyde Dismutase, peroxydases, Catalase, etc), un système non-enzymatique (caroténoïdes, ascorbate, glutathion, alpha-tocophérol, etc) et des systèmes de réparation de l'ADN (Apel et Hirt, 2004). Plusieurs études ont évalué l'activité anti-oxydante de certaines espèces comme *Botryococcus braunii* (Rao et al., 2006), *Chlorella* sp. (Wu et al., 2005), *Dunaliella salina* (Herrero et al., 2006), *Synechococcus* sp. (FACHB 283), *Chlamydomonas nivalis*, *Nostoc ellipsosporum* (Li et al., 2007), *Phaeodactylum tricornutum* (Guzman et al., 2001), *Polysiphonia urceolata* (Duan et al., 2006), *Scytosiphon* sp. (Kuda et al., 2005) et *Spirulina platensis* (Jaime et al., 2005). Selon Hajimahmoodi et al. (2010) la plupart des micro-algues et cyanobactéries ont un pouvoir anti-oxydant moyen ($10-100 \text{ pmol Fe (II) g}^{-1}$) par rapport aux plantes ($1,9-532 \text{ pmol Fe (II) g}^{-1}$; Wong et al., 2006). En effet, Li et al. (2007) ont observé que les plantes sont plus riches en anti-oxydants (pourcentage de neutralisation des radicaux libres: radical-scavenging RS%) que les cyanobactéries telles que *Anabaena cylindrica* ($84,91\% \pm 4,89$), *Nostoc muscorum* ($45,24\% \pm 2,78$), et *Nostoc* sp ($41,81\% \pm 2,56$).

Le système enzymatique anti-oxydant, qui est un indicateur de stress, comprend la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX), la glutathion peroxydase (GPX) et la catalase (CAT) (Fig. 13). La SOD joue un rôle important contre les dommages oxydatifs

(Bowler et al., 1992). Elle agit comme une première ligne de défense contre les ROS (Apel et Hirt, 2004).

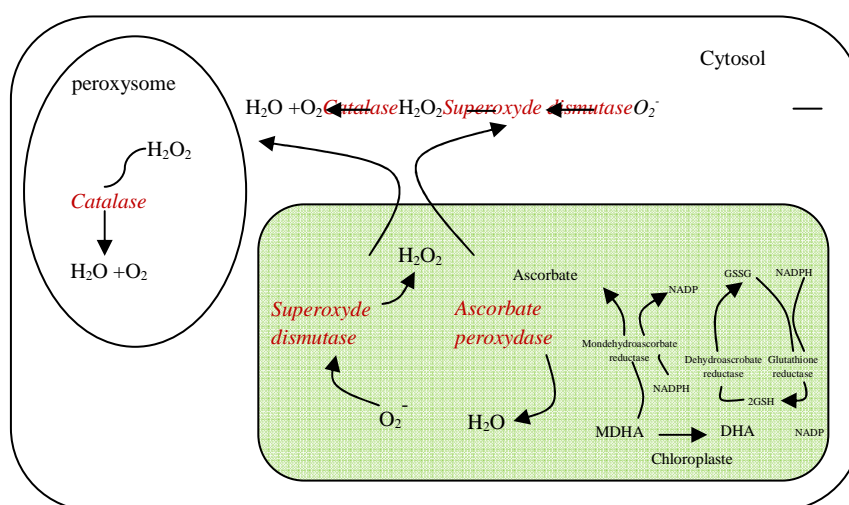


Figure 13. Schéma du mécanisme anti-oxydant enzymatique dans une cellule foliaire chlorophyllienne (Cycle de Asada-Halliwell dans le chloroplaste, Rijstenbil, 2002).

Les réponses physiologiques et biochimiques sont largement étudiées pour comprendre comment les micro-algues réagissent et s'acclimatent aux changements de salinité (Kirst, 1990). Toutefois, l'effet du stress salin sur l'induction du stress oxydatif a été peu étudié chez les micro-algues (Jahnke et White, 2003; Liu et al., 2007). Selon Rijstenbil (2003), les rayonnements UV et le stress salin stimulent la production des ROS et déclenchent le système anti-oxydant et en particulier la superoxyde dismutase (SOD) chez *Cylindrotheca closterium* (Mallick et Mohn, 2000). L'accumulation des ROS suite à un stress salin a également été observé chez *Chlamydomonas reinhardtii* (Yoshida et al., 2004) mais l'augmentation de la salinité n'a pas d'incidence sur la production de ROS chez *Chattonella marina* (Liu et al., 2007). Selon Jahnke et White (2003), le stress salin augmente les activités enzymatiques anti-oxydantes APX, SOD, GR et CAT chez la microalgue marine *Dunaliella tertiolecta*. La SOD est aussi une composante importante dans le système anti-oxydant chez les cyanobactéries (Shirkey et al., 2000). Qiu et al. (2003) n'ont pas détecté l'activité APX chez *Nostoc flagelliforme*. Cette enzyme est la plus apte à éliminer le H_2O_2 chez les micro-algues (Rijstenbil, 2003). Selon Sugimoto et Sakamoto (1997) et Leisinger et al. (1999), les concentrations en glutathion peroxydase (GPX) augmentent en réponse à un niveau

d'éclairement élevé, à une osmolarité élevée ou à une salinité élevée. GPX permet également de protéger les cellules de la peroxydation des lipides. Plusieurs gènes, codant des protéines GPX similaires à celles rencontrées chez les animaux, ont été identifiées chez *Chlamydomonas* (Yokota et al., 1988). *Synechocystis* PCC 6803 contient deux types de GPX: GPX-1 (Glutathion peroxydase1) et GPX-2 (Glutathion peroxydase2). L'activité GPX-1 augmente progressivement dans des conditions de stress oxydatif imposées par un fort éclairement et une forte salinité. Selon Gaber et al. (2004), GPX-1 et GPX-2 sont essentielles pour l'élimination des hydroperoxydes lipidiques dans des conditions normales et de stress, conduisant à la protection de l'intégrité membranaire.

Le système anti-oxydant non enzymatique, induit par un stress, comprend principalement l'ascorbate, le glutathion (GSH), les flavonoïdes, le tocophérol, les alcaloïdes et les caroténoïdes (Apel et Hirt, 2004). Leur biosynthèse est activée par un stress salin (Hernandez et al., 2001). Les caroténoïdes sont des pigments très diversifiés (Han et al., 2008) et participent à la capture de l'énergie lumineuse pour la photosynthèse (Tao et al., 2007). Le glutathion répare les dommages dans les chloroplastes via le cycle de l'ascorbate-glutathion (ou cycle de Halliwell-Asada) (Fig. 13). Le rôle des flavonoïdes dans la détoxification des ROS n'est pas direct, par contre, les caroténoïdes et notamment les xanthophylles jouent un rôle majeur dans les chloroplastes lorsqu'ils sont exposés à un fort éclairement (Apel et Hirt, 2004).

Lorsque les plantes sont exposées à des niveaux d'éclairement élevés, la chaîne de transport des électrons est sur-réduite, ce qui conduit à l'inactivation du PSII et l'inhibition de la photosynthèse. Les plantes possèdent trois mécanismes pour protéger l'appareil photosynthétique contre la photo-inhibition: le premier est une dissipation thermique de l'énergie d'excitation en excès dans l'antenne du PSII grâce au cycle des xanthophylles (dissipation non photochimique = nonphotochemical quenching), le second consiste à transférer des électrons du PSII à différents accepteurs à l'intérieur du chloroplaste (photochimie = photochemical quenching) (Munns et Tester, 2008) et le troisième est une dissipation de l'énergie sous forme de fluorescence (Ort et Baker, 2002). En effet, le cycle des xanthophylles agit en tant que photo-protecteur régulant l'intensité lumineuse (Fujiki et al., 2003). Selon Müller et al. (2001), il existe deux voies du cycle des xanthophylles en fonction des organismes. Chez les plantes, les Chlorophycées et les Phéophycées, la voie de la violaxanthine : la dé-époxydation de la violaxanthine, avec deux groupes époxydes, en anthéroxanthine (avec un groupe époxyde) et ensuite en zéaxanthine (sans groupe époxyde)

suite à l'acidification du lumen (Demmings et Adam, 1996). Les diatomées convertissent la diadinoxanthine (un seul groupe époxyde) en diatoxanthine (sans groupe époxyde) (Nymark et al., 2009; Fujiki et al., 2003; Müller et al., 2001).

4.3. Les différents transporteurs d'ions

Tous les organismes ont développé des mécanismes pour réguler leur pH et leur équilibres ionique. Ces mécanismes sont induits par des facteurs externes. Les procaryotes s'acclimatent grâce aux transporteurs localisés au niveau de la membrane plasmique. Chez les eucaryotes, la taille de la cellule est plus grande et contient plus de membranes endocellulaires (ex : organites). Par conséquent, le nombre de transporteurs d'ions a aussi augmenté (Chanrojet al., 2012). Par exemple, les algues à cellules géantes contiennent des vacuoles qui servent à accumuler les ions inorganiques pour maintenir l'équilibre osmotique (Rai et Gaur, 2001). Les transporteurs de H^+ (monovalent cation-proton antiporter : CPA) permettent de répondre à des stress. Les antiports cation monovalent/ H^+ de type CPA (Fig. 14) permettent de réguler le pH et de maintenir l'homéostasie via l'échange de Na^+ , Li^+ ou K^+ avec un H^+ . Ces antiports sont divisés en deux superfamilles. La première est celle des CPA1 qui sont les gènes codant des antiports Na^+/H^+ rencontrés chez les bactéries, les champignons, les métazoaires et les plantes (Fig. 14, 15), ils sont largement étudiés. Par contre, les antiports de type CPA2 sont peu étudiés. Cette famille de gènes code les transporteurs d'ions K^+ de type KEA ou de type CHX (antiport cation/ H^+) (Chanrojet al., 2012).

Les analyses phylogénétiques montrent qu'il y a trois clades différents du gène CPA1 codant les antiports Na^+/H^+ . Ce type de transporteurs assure la régulation du pH interne, le volume cellulaire et le maintien d'un faible niveau de sodium dans le cytoplasme (Blumwald et al., 2000).

Le premier clade regroupe les gènes NHX codant des antiports Na^+/H^+ membranaires tels que SOS1 et AtNHX7 (des antiports Na^+/H^+ membranaires identifiés chez *A. thaliana*; Chanrojet et al., 2012, Fig. 15). Le gène SOS1 a été récemment isolé chez *A. thaliana*. Ce gène est essentiel pour l'équilibre entre les ions Na^+ et H^+ (Shi et al., 2000). L'expression du système SOS (détail p.55) est particulièrement stimulée par le stress salin, surtout au niveau des racines (Hamada et al., 2001). Le gène SOS1 présente une homologie avec le gène NhaP (gène bactérien ancestral codant l'antiport Na^+/H^+) chez *Pseudomonas aeruginosa* (Utsugi et al., 1998). En effet, il existe un lien ancestral entre le transporteur SOS1, AtNHX7 et le transporteur NhaP (31% à 34% d'identité, respectivement) identifiés chez les procaryotes,

essentiellement les cyanobactéries (Hamada et al., 2001). Le génome séquencé de *Synechocystis* sp. 6803 contient cinq gènes codant des antiports Na^+/H^+ (Kaneko et al., 1996). Parmi ces 5 gènes, deux gènes de type Syn-NhaP1 et Syn-NhaP2 (gènes codant l'antiport Na^+/H^+ identifié chez *Synechocystis*) sont homologues (environ 33% d'homologie) au gène NhaP chez *Pseudomonas aeruginosa*. La séquence d'acides aminés déduite du gène SynNhaP1 présente une plus grande similitude avec les transporteurs SOS1 et NhaP qu'avec le transporteur SynNhaP2 (Hamada et al., 2001). Les transporteurs Ap-NhaP1 (antiport Na^+/H^+ identifié chez *Aphanothece halophytica*) et Syn-NhaP1 (antiport Na^+/H^+ identifié chez *Synechocystis* sp.) possèdent une activité d'échange d'ions Na^+/H^+ importante dans une large gamme de pH. La surexpression du gène Ap-NhaP1 confère une tolérance au sel à une espèce d'eau douce transformée : *Synechococcus* sp. (PCC 7942) qui devient alors capable de survivre dans l'eau de mer (Waditee et al., 2001). L'expression du gène ApNhaP améliore considérablement la tolérance au sel chez les cyanobactéries marines comme *Synechococcus*, l'efflux de Na^+ par cet antiport serait une clé importante dans la tolérance au sel (Waditee et al., 2001, 2002). En conclusion, les antiports Na^+/H^+ sont très conservés depuis les procaryotes jusqu'aux plantes terrestres comme *A. thaliana*.

Le deuxième clade est constitué de transporteurs de type AtNHX5/6. Ces derniers sont des transporteurs intracellulaires de type NHE (gènes codant des antiports Na^+/H^+ endoplasmiques) chez les eucaryotes (Chanrojet al., 2012, Fig. 15).

Le troisième clade est constitué par les NHX (gènes codant des antiports Na^+/H^+ vacuolaires) tels que les transporteurs (AtNHX1-4) qui sont spécifiques aux plantes (Chanrojet al., 2012). En effet, le transporteur codé par le gène NHX1 a été isolé chez *A. thaliana* (AtNHX1 : antiport tonoplastique Na^+/H^+ *A. thaliana*; Gaxiola et al., 1999) et chez *Oryza sativa* (Fukuda et al., 1999). Sa surexpression a été stimulée suite à un stress au NaCl (Apse et al., 1999). L'analyse phylogénétique de Shi et al. (2000) montre une divergence entre les antiports Na^+/H^+ AtNHX1, NHX1 et l'antiport NHE6 (antiport Na^+/H^+ endomembranaire).

Les antiports protons/cations monovalents (CPA-2) ont été identifiés chez *A. thaliana* (35 transporteurs de cette famille), mais ils sont inexistantes chez les mammifères. Chez les procaryotes, cette famille est représentée par le transporteur MagA (K^+/H^+ antiport) chez *Magnetospirillum* sp. (Nakamura et al., 1995), les transporteurs KefB et KefC (antiport K^+/H^+ ou uniport K^+) chez *E. coli* peuvent rejeter les ions K^+ lorsqu'ils sont stimulés par le glutathion, et le transporteur NapA (antiport Na^+/H^+) chez *Enterococcus hirae* (Waser et

al., 1992). Les transporteurs GrmA (transporteurs de Na^+ , Li^+/H^+ , K^+) chez *Bacillus megaterium* (Tani et al., 1996) et GerN (Na^+ , Li^+/H^+ , K^+) chez *Bacillus cereus* (Southworth et al., 2001; Thackray et al., 2001) font partie aussi de cette famille CPA-2. *Aphanothece halophytica* contient au moins deux gènes Ap-NapA1-1 et Ap-NapA1-2 (antiport Na^+/H^+ chez *Aphanothece halophytica*) homologues à Syn-NapA1 (antiport Na^+/H^+ chez *Synechococcus* sp). Ces gènes Ap-NapA1-1 et Ap-NapA1-2 sont capables de transporter les ions Na^+/H^+ et Li^+/H^+ . Ap-NapA1-2 montre aussi une capacité à transporter le K^+ . L'activité du transporteur NapA1 est pH-dépendante, elle est importante à pH alcalin, ce qui le diffère des antiports NhaP1 (gène ancestral des antiports chez les bactérie).

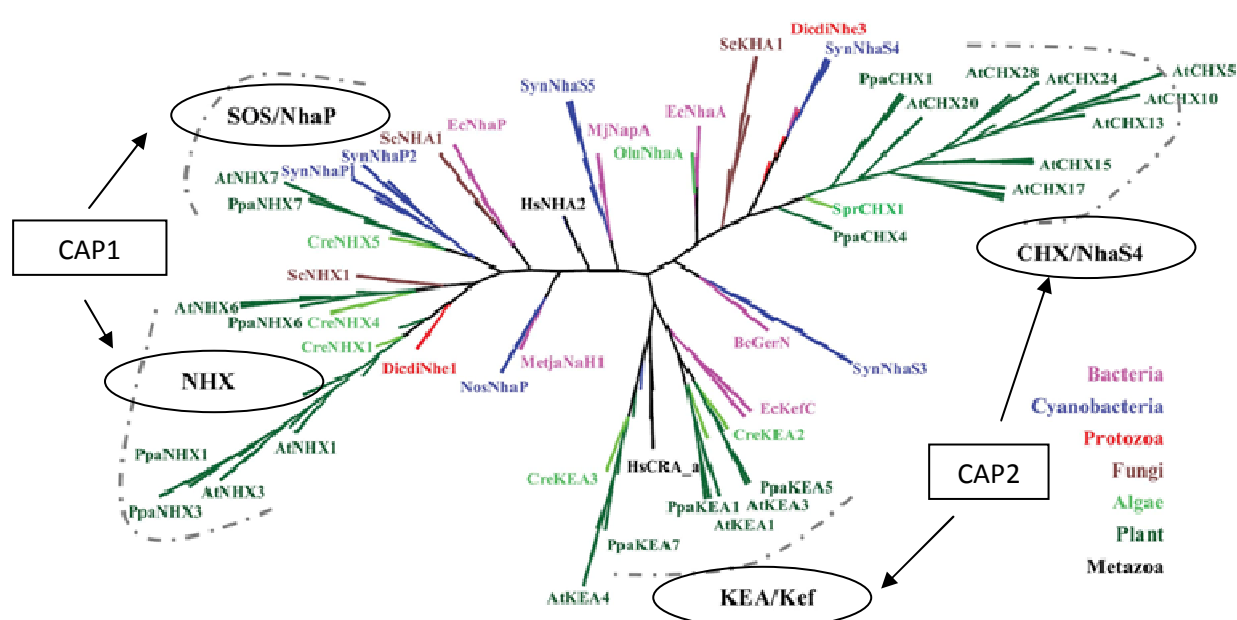


Figure 14. Evolution des antiports cation-proton appartenant aux familles CPA1 et CPA2 (Chanrojet al., 2012).

le transport se fait contre le gradient électrochimique (Niu et al., 1995 ; Blumwald et al., 2000). Le sodium est exporté à partir du cytoplasme principalement par les transporteurs Na^+/H^+ et Na^+ -ATPases (Kaku et al., 2000). Ces transporteurs jouent un rôle physiologique majeur dans l'adaptation au sel (Serrano et al., 1999). Chez la plupart des cyanobactéries, les cellules rejettent les ions sodium en 10 à 20 min suite à un stress salin (Joset et al., 1996).

Il en résulte de ce qui précède que les canaux membranaires ont un rôle majeur dans le rejet de l'excès de sodium et dans le maintien d'une concentration en sel compatible avec le métabolisme. La concentration intracellulaire en sodium d'une microalgue ou d'une cyanobactérie reste un sujet de discussion (Hagemann et Erdmann, 1997). Cette concentration a été calculée en utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN) du ^{23}Na et la microanalyse par rayons X. Ces deux méthodes indiquent que la concentration reste inchangée durant la période d'acclimatation des cellules de *Dunaliella salina* et *Synechococcus* sp. (PCC6311) au sel (Raiet Gaur, 2001). Par exemple chez *Dunaliella tertiolecta*, la concentration intra-cellulaire est de l'ordre de 65 mM alors que la concentration externe est de 3 M. Chez *Dunaliella salina*, la concentration est comprise entre 20 et 100 mM de Na^+ si les cellules sont cultivées dans un milieu ayant une concentration variant de 1 à 4 M de NaCl (Pick et al., 1986). La constance de la concentration intra-cellulaire indique clairement que cette espèce rejette les ions Na^+ à l'extérieur de la cellule contre le gradient électrochimique du sodium grâce à des antiports Na^+/H^+ qui sont activés par une force protomotrice (Katz et al., 1986). Ce type de transporteur a été mis en évidence chez la plupart des organismes, y compris les micro-algues (Katz et al., 1989) et les cyanobactéries (Stematakis et al., 1999). L'importance des antiports Na^+/H^+ a été déterminée par l'emploi d'inhibiteurs interférant directement ou indirectement avec leur activité (Stamalakos et al., 1999). La force protomotrice est généralement générée par les ATPases H^+ de la membrane plasmique, qui ont déjà été identifiées (Katz et al., 1986) et clonées (Rai et Gaur, 2001). Les cyanobactéries possèdent un autre mécanisme : la cytochrome oxydase est impliquée dans l'extrusion de Na^+ des cellules de *Spirulina subsalsa* suite à un stress salin. En effet, pendant les premières 48h d'un choc salin (eau de mer artificielle + NaCl 1 M), les cellules expulsent le Na^+ via les antiports. Le gradient de protons est généré par des complexes enzymatiques dont la cytochrome oxydase associée aux transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui est stimulée par ce stress (Gabbay-Azaria et al., 1992). Chez *Synechocystis* sp. PCC6803, l'efflux de sodium est déclenché lorsque le pH s'élève au-dessus de 7,5 pour assurer l'homéostasie (Serrano et al., 1999).

Un autre type de transporteurs de sodium a été caractérisé, il s'agit d'une pompe à sodium régulée par l'ATP. Ce type de transporteurs se trouve aussi chez les macro-algues d'eau douce comme *Chara australis* (Smith et Walker, 1989). Récemment, il a été étudié en détail chez la micro-algue marine *Tetraselmis viridis* (*Platymonas*) (Popva et al., 1999) et chez *Heterosigma akashiwo* (Shono et al., 1996). Jusqu'à maintenant, il n'a pas été mis en évidence chez les plantes (Rai et Gaur, 2001), tandis que les transporteurs de type ABC-ATPase (ATP-binding cassette [ABC] : ensemble de protéines trans-membranaires dont le rôle est le transport uni-directionnel de part et d'autre de la membrane cytoplasmique de diverses substances telles que les ions, stérols, macromolécules, etc. ...en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP) sont présents chez les plantes mais absents chez les algues et les cyanobactéries (Serrano et al., 1999).

La régulation de l'activité des canaux dépend d'une cascade de signaux. Les récepteurs et la chaîne de transduction du signal de l'équilibre osmotique chez les algues ont été étudiés par Bisson et Krist (1995). La détection du stress osmotique serait assurée par le cytosquelette : le changement anisotrope de la membrane est dû à une tension ou un étirement des composants électrochimiques de la membrane (Kirst, 1990). Cependant, aucun osmo-récepteur n'a été identifié chez les algues et les cyanobactéries jusqu'à maintenant. La turgescence et le volume cellulaire sont deux signaux de rétro-contrôle négatif, capables de contrôler les voies biosynthétiques (Rai et Gaur, 2001). La chaîne de transduction du signal n'a pas été décrite en détail chez les algues et les cyanobactéries (Rai et Gaur, 2001). Habituellement, l'ion calcium est un second messager faisant le lien entre les récepteurs de la membrane plasmique et les voies de biosynthèse. Selon Ko et Lee (1995), les ions Na^+ en excès induisent une augmentation des concentrations de Ca^{2+} via des transporteurs de calcium. La calmoduline, protéine Ca^{2+} dépendante, est alors activée et déclenche la synthèse du glycérol qui maintient l'équilibre ionique et empêche l'entrée du sodium (Novikova et al., 2007). Chez l'algue verte *Dunaliella tertiolecta*, des peptides de 28-32 kDa sont transitoirement phosphorylés, suite à un choc osmotique (Yuasa et Muto, 1992). De plus, deux protéines kinases Ca^{2+} dépendantes, Lap et Hap, sont activées quand les cellules de *Dunaliella* sont exposées à un choc hyper ou hypo-osmotique, respectivement. Une protéine de taille égale à 252 KDa inhibe les deux kinases et régule le volume cellulaire après un choc osmotique. On peut en conclure que les deux protéines kinases interviennent dans la cascade de signalisation lors d'une acclimatation au sel (Yuasa et Muto, 1996). Ligterink et Hirt, 1999 ont pu identifier des récepteurs qui transmettent l'information via une série de

phosphorylation–déphosphorylation des sérine/thréonine protein kinases (MAPKs) qui va mener à une activation du transporteur de sodium ATP-dépendant chez les microalgues *Heterosigma akasiwo* et *Tetraselmis* (Shono et al., 1996; Popva et al., 1999). Chez la cyanobactérie *Anabena* sp. PCC7120, la détection du stress est assuré par le gène *orrA* (gène de réponse au stress osmotique, Schwartz et al., 1998).

Weiss et Pick (1990) et Katz et al. (1991) ont montré que les antiport Na^+/H^+ catalysent l'entrée des ions H^+ plutôt que leur efflux et sont activés, lorsque le cytosol devient acide ou suite à un choc osmotique. Pick (1992) suggère que les transporteurs Na^+ -ATPase peuvent assurer l'efflux de sodium chez *Dunaliella salina*. Puis en 2001, Katz et Pick suggèrent que l'efflux de Na^+ chez *Dunaliella* est lié au système de transport membranaire redox. Ce système cède un électron de NADH à ubiquinol. Ce type de transport, appelé NADH quinone réductase, est couplé indirectement à l'extrusion du sodium. Suite à un stress salin, les ions Na^+ pénètrent grâce à des ionophores (solutés ou composés solides ioniques qui portent les ions tels que NaCl ou CaF_2). Cette élévation stimule la réduction d'un accepteur d'électrons extracellulaire, tel que le ferricyanure (FeCN). Des inhibiteurs de transporteurs d'électrons membranaires, comme les quinones et le dicumarol, inhibent la réduction FeCN et l'extrusion du sodium. La concentration moyenne intra-cellulaire en K^+ chez *Dunaliella* est de l'ordre de 100 à 200 mM. Elle est maintenue constante sur une large gamme de salinité (Ehrenfeld et Cousin, 1984). Certains auteurs suggèrent l'existence de transporteurs de K^+ chez *Dunaliella*, présentant une forte sélectivité vis à vis du K^+ . Le rapport d'efflux entre les ions K^+ et Na^+ est supérieur à 5000. Cette sélectivité élevée est nécessaire pour un organisme vivant dans un milieu extrême et pour maintenir une faible concentration en Na^+ à l'intérieur des cellules (Chen et Jiang, 2009). Balnokin et al. (1984) suggèrent que l'absorption des ions K^+ est passive. Ehrenfeld et Cousin (1984) ont observé un échange rapide entre les ions Na^+ et K^+ suite à un choc osmotique et ont suggéré un mécanisme d'échange actif (Fig. 16).

Dunaliella peut croître en présence d'une large gamme de concentrations en Ca^{2+} qui atteint 10 mM (Chen et Jiang, 2009). Contrairement à l'ion K^+ , le Ca^{2+} est accumulé dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique.

L'accumulation de Ca^{2+} par *Dunaliella* laisse penser que cet ion possède un rôle particulier chez cette microalgue. Les ions Ca^{2+} jouent un rôle clé dans la transduction du signal et dans la régulation de plusieurs processus au niveau des cellules des plantes (Chen et Jiang, 2009). Roux et Serlin (1987) et Guo et Roux (1990) supposent que l'ion Ca^{2+} joue un rôle similaire chez *Dunaliella*. Tsukahara et al. (1999) pensent que l'entrée de Ca^{2+} depuis

l'apoplasme par des canaux calciques localisés au niveau du plasmalemme est nécessaire pour la transduction du signal osmotique chez *D. tertiolecta* (Fig. 16).

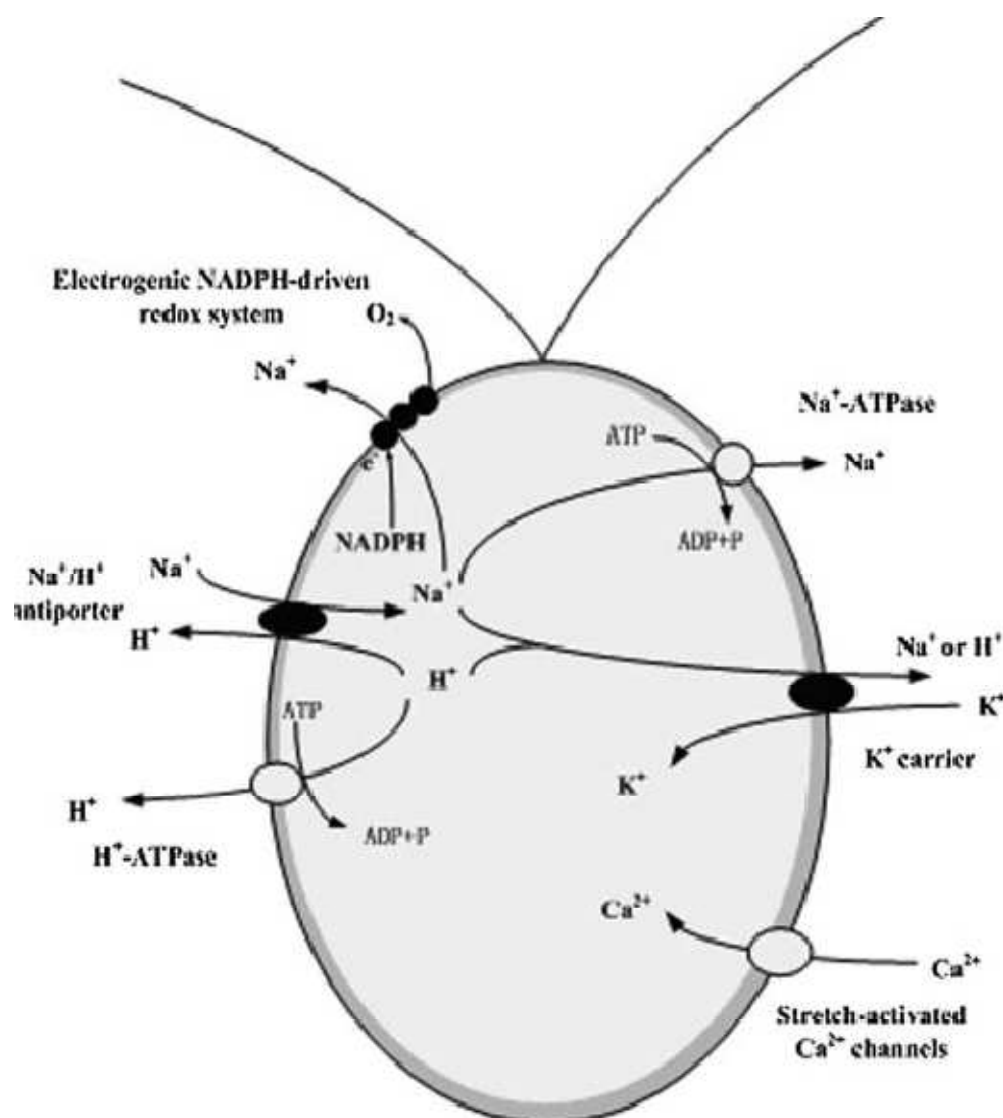


Figure 16. Différents systèmes de transport d'ions identifiés chez le genre *Dunaliella* (Chen et Jiang, 2009).

Les cellules maintiennent une concentration élevée en K^+ et une faible concentration en Na^+ dans des conditions optimales de croissance. L'homéostasie intracellulaire K^+/Na^+ est importante pour le fonctionnement de nombreuses enzymes, le maintien du potentiel de membrane et la régulation du volume cellulaire (Halfter et al., 2000; Serrano et Navarro, 2001). La concentration intracellulaire en K^+ est supérieure à celle de l'environnement. Par

conséquent, les ions K^+ pénètrent à l'intérieur des cellules par des transporteurs spécifiques (Halfter et al., 2000; Serrano et al., 1999).

Pour certains micro-organismes, le Na^+ est essentiel pour le transport de certains composés et même pour la division cellulaire (Kaplan et al., 1984). Chez les cyanobactéries, la photolyse de l'eau par le PSII et l'activation de la nitrogénase dépendent du sodium (Thomas et Apte, 1984).

La membrane plasmique assure la communication entre la cellule et son environnement et joue un rôle important dans l'adaptation au sel. Lorsque les cellules de *Synechocystis* 6311 sont exposées au sel, la membrane devient moins perméable et plus stable, en raison d'une augmentation de la proportion d'acides gras saturés à longue chaîne et de la quantité de protéines (Blumwald et al., 1983). La régulation du niveau de saturation des acides gras membranaires est un élément important de l'adaptation aux conditions environnementales. La microscopie électronique a permis de montrer que le stress salin augmente la densité des particules protéiques dans les cellules d'*Anacystis nidulans* (Molitor et al., 1990). Une étude des protéines périplasmiques a montré, que la biosynthèse de la membrane de la paroi cellulaire joue un rôle important dans l'adaptation au sel chez *Synechocystis* sp.6311. Lorsque les cellules sont exposées au stress salin, la membrane devient moins perméable et plus stable en raison d'une augmentation de la proportion de longue chaîne des acides gras saturés et dans le contenu protéiques de la membrane (Karandashova et Elanskaya, 2005). Une augmentation de la fluidité membranaire, suite à des changements dans le niveau de saturation des acides gras, peut accélérer l'activation des transporteurs. L'activité de nombreuses enzymes associées à la membrane peut changer en fonction de la fluidité de la membrane (Allakhverdiev et al., 1999). Les aquaporines, qui sont des pores perméables aux molécules d'eau dans les membranes biologiques, sont impliquées dans la réponse au sel et peuvent changer leur activité en fonction de la composition lipidique ou l'état de la membrane (Allakhverdiev et al., 2001). Chez *Synechocystis* 6803, le gène codant les aquaporines joue un rôle important dans la régulation d'eau dans la cellule suite à un stress osmotique (Shapiguzov et al., 2005). Le stress salin augmente la fluidité des membranes et réduit leur perméabilité aux ions H^+ et Na^+ chez *Synechococcus* sp. 6311. Suite à un stress salin, les acides gras membranaires les plus fréquents sont les acides gras insaturés et les dérivés de phosphatidylglycérol. Chez *A. halophytica*, les dérivés phosphatidylglycerols représentent jusqu'à 75 % des lipides membranaires suite à un stress salin. La teneur élevée en

lipides polaires augmente la charge à la surface de la membrane provoquant une modification des propriétés d'échange d'ions (Joset et al., 1996).

5. Le système Salt Overly Sensitive (SOS) chez les plantes terrestres

Les plantes ont développé des mécanismes pour maintenir de faibles concentrations de sodium dans le cytoplasme. Le système SOS (Salt Overly Sensitive), mis en évidence par Zhu (2000) chez *A. thaliana*, est essentiel pour maintenir une faible concentration en Na^+ dans le cytoplasme, suite à un stress salin (Zhu et al., 1998 ; Zhu, 2003). Le système SOS comprend un antiport H^+/Na^+ (SOS1) au niveau de la membrane plasmique et deux protéines cytosoliques SOS2 et SOS3. Lorsque la concentration externe en Na^+ est élevée, l'entrée massive de Na^+ provoque une augmentation de la teneur en Ca^{2+} intracellulaire. Le Ca^{2+} vient se fixer sur la protéine SOS3, celle-ci active la protéine SOS2 qui va phosphoryler SOS1. Ce dernier devient alors actif et expulse des ions Na^+ en dehors de la cellule (Fig. 17; Zhu, 2000).

Chez *A. thaliana*, SOS1 est un antiport Na^+/H^+ trans-membranaire (Shi et al., 2000; Qiu et al., 2002). Le gène SOS1 est essentiel pour l'homéostasie des ions Na^+ . Le gène SOS1 est significativement exprimé suite à un stress salin (Shi et al., 2003), en particulier au niveau des racines (Hamada et al., 2001), plus précisément du rhizoderme, et au niveau des cellules du parenchyme bordant le xylème (Chinnusamy et al., 2006). SOS1 est une protéine ayant une taille de 127kD. L'antiport trans-membranaire SOS1 (Na^+/H^+) est doté d'une extrémité longue du côté cytoplasmique qui pourrait servir de senseur de Na^+ (Shi et al., 2000). En se basant sur l'analyse des alignements des séquences, il existe des régions de similitude entre SOS1, l'antiport trans-membranaire Na^+/H^+ SynNhaP chez *Synechocystis* spp. et l'antiport NhaP chez *Pseudomonas aeruginosa* (Hamada et al., 2001; Utsugi et al., 1998). Elle présente également une forte homologie de séquences protéiques des domaines conservés avec l'antiport trans-membranaire Na^+/H^+ des bactéries, des champignons et des animaux (Chinnusamy et al., 2006).

SOS3 est une protéine calcium-dépendante, myristoylée et dotée d'un doigt en EF (un motif protéique constitué de deux hélice alpha) piégeant un ion Ca^{2+} ; Ishitani et al., 2000). Elle détecte une augmentation de concentration en Ca^{2+} et possède un site de fixation pour le Ca^{2+} en utilisant le doigt en EF (Ishitani et al., 2000; Zhu, 2002; Ward et al., 2003). Cette caractéristique est rencontrée chez toutes les protéines de types SCaBPs (calcium-binding proteins).

SOS2 est une sérine / thréonine protéine kinase (Ser / Thr kinase) rencontrée chez les plantes (Halfter et al., 2000; Guo et al., 2001) avec un domaine C-terminal de régulation et un domaine catalytique N-terminal (Liu et al., 2000). Ishitani et al. (2000) ont montré que l'affinité entre le Ca^{2+} et SOS3 est faible par rapport à celle entre le Ca^{2+} et la calmoduline. Cette différence d'affinité serait un mécanisme permettant de distinguer différents niveaux de signaux. Lorsque SOS3 est activée, elle vient se fixer sur le domaine régulateur de SOS2 (Ser / Thr kinase), levant l'inhibition du domaine catalytique de SOS2. Le domaine de régulation C-terminal de SOS2 se compose d'un motif d'auto-inhibition de type FISL (21 amino-acides ayant des résidus A, F, I, S, L conservé, d'où le nom FISL motif) qui se lie spécifiquement à SOS3 (Liu et al., 2000; Guo et al., 2001).

La fonction du complexe SOS2-SOS3 dépend de l'interaction physique et la régulation entre SOS2 et SOS3 (Halfter et al., 2000). La liaison de SOS3 au domaine régulateur semble perturber l'interaction intra-moléculaire de SOS2, ouvrant ainsi le site catalytique (Zhu, 2002). Des essais de phosphorylation *in vitro* ont montré que le calcium est nécessaire pour activer la kinase du complexe SOS2-SOS3 (Halfter et al., 2000). Shi et al. (2000) montrent que la cible du complexe SOS3-SOS2 est l'antiport SOS1. Le complexe SOS2-SOS3 phosphoryle et active l'antiport SOS1 qui expulse alors le Na^+ (Quintero et al., 2002) (Fig. 17). SOS2 régule l'efflux de Na^+ mais aussi le compartimentation vacuolaire (Fig. 18). Une protéine Ca^{2+} dépendante (SCaBPs) active SOS2 qui active à son tour l'antiport Na^+ / H^+ (NHXs) au niveau du tonoplaste.

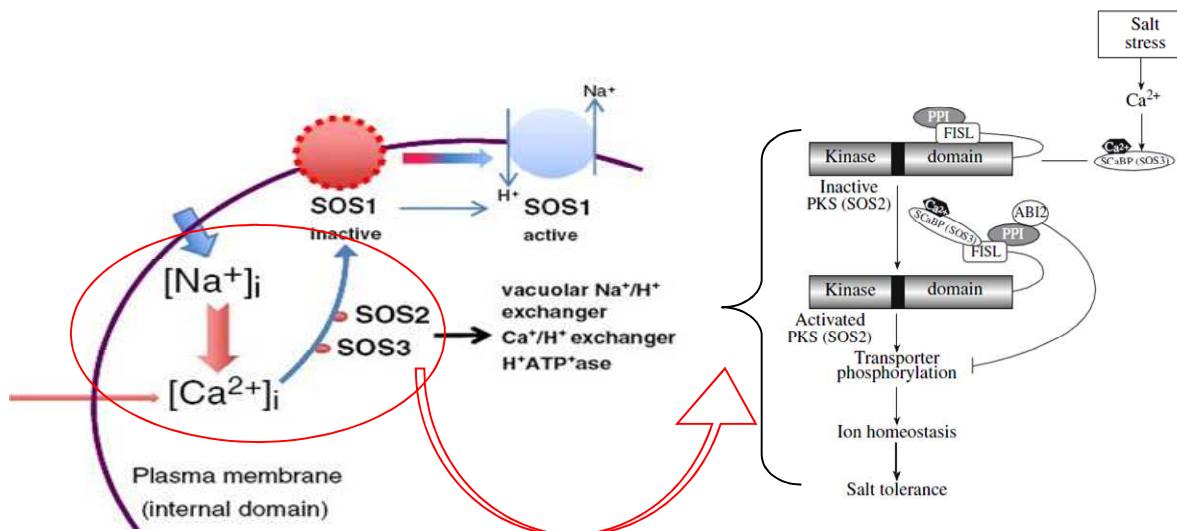


Figure 17. Schéma du système Salt Overly Sensitive (SOS). L'augmentation de la teneur en NaCl dans le milieu extérieur entraîne une augmentation de la teneur intracellulaire en Ca^{2+} .

Le Ca^{2+} se fixe sur la protéine SOS3. Celle-ci active la protéine SOS2 qui va phosphoryler SOS1. Ce dernier devient alors actif et expulse des ions Na^+ en dehors de la cellule (Novikova et al., 2007; Bertorello et Zhu, 2009).

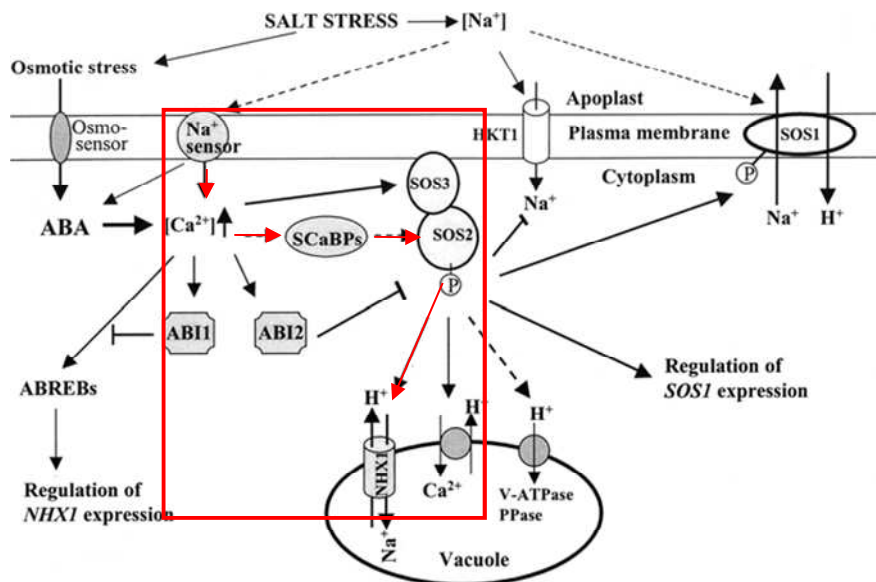


Figure 18. Efflux de Na^+ d'une cellule et son compartimentage vacuolaire grâce au système SOS (Munns et Tester, 2008).

6. L'effet de lumière sur les micro-algues

Les micro-algues ont besoin d'énergie solaire pour synthétiser leur propre matière organique, afin de croître et assurer leur métabolisme (Huzisige et Ke, 1993). Cependant cette croissance est affectée par l'intensité lumineuse et la variation de la photopériode (Mata et al., 2010; Parmar et al., 2011; Wahidin et al., 2013). En effet, le taux de croissance des micro-algues ne suit pas linéairement l'intensité lumineuse. Aux forts éclairagements, le flux de photons est saturé, ce qui perturbe la croissance et la respiration (Sukenik et al., 1989; Gilstad et al., 1993). Selon Sforza et al. (2012), le taux de croissance chez *Nannochloropsis salina* est égal à 0,55 et 0,35 sous l'éclairement 180 et 220 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivement alors qu'il diminue et sa valeur se stabilise à environ 0,15, lorsque l'éclairement varie entre 400 et 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La lumière peut être un facteur limitant pour la croissance des micro-algues. L'éclairement excessif peut conduire à la photo-inhibition et des dommages au niveau des mécanismes assurant le métabolisme cellulaire (Li et al., 2009; Sforza et al., 2012). L'alternance jour / nuit est bénéfique pour l'efficacité photosynthétique (Sforza et al., 2012). L'activité photosynthétique augmente de 6 à 8 $\text{mg O}_2 \text{mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$ ainsi que la respiration (de 3 à 4 $\text{mg O}_2 \text{mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$) chez *Chlorella pyrenoidos*, lorsque la photopériode change de 13/11 à 16/4 jour/nuit; mais au delà de 17 heures d'éclairement la photosynthèse reste la même (8 $\text{mg O}_2 \text{mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$), mais la respiration diminue (2 $\text{mg O}_2 \text{mg}^{-1} \text{Chl a h}^{-1}$; Grobbelaar et al., 1992). Le régime photopériodique permet aux cellules de synthétiser et d'accumuler les métabolites dont elles ont besoin à partir de l'énergie biochimique assimilée pendant la phase lumineuse (Shifrin et Chisholm, 1981; Sukenik et Carmeli 1990; Fabregas et al., 2004). Selon Sukenik et Carmeli (1990), la plupart des espèces phytoplanctoniques synthétisent divers composés, tels que les protéines, pendant la phase obscure si les conditions sont favorables pour la croissance. En revanche, si les conditions sont défavorables, la production de lipides sera stimulée (Harwati et al., 2012). Les travaux de Sforza et al. (2012) montrent que l'intensité lumineuse inférieure ou égale à 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ génère de faibles quantités en lipides (environ 10% de la matière sèche) alors que l'intensité lumineuse égale à 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ stimule la production des lipides (70% de la matière sèche). Wahidin et al. (2013) ont montré que la culture de *Nannochloropsis* sp. sous l'intensité lumineuse 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et une photopériode de 18 h favorisent la croissance (densité cellulaire maximale $6,5 \cdot 10^7$ cellules mL^{-1}) et l'accumulation de lipides (31,3% de la matière sèche) par rapport à une culture en lumière continue (24 h) (densité cellulaire maximale $3,8 \cdot 10^7$ cellules mL^{-1} , lipides 25 % de la matière sèche). La densité maximale de cette même espèce est inférieure à $5 \cdot 10^7$ cellules mL^{-1} .

lorsque les cellules sont soumises à différentes intensités lumineuses (50, 100 et 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et photopériodes (24:0; 12:12; 18:6). De plus, la lumière et la température élevées génèrent la production d'acides gras saturés plus que celle produite sous faible éclairage et faible température (Sushchik et al., 2003; Olofsson et al., 2012). Sous un faible éclairage (70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), les teneurs en lipides représentent près du quart de la matière sèche des cellules de *Chlorella sorokiniana*, soit une augmentation de 32 % par rapport aux cultures réalisées sous une intensité lumineuse de 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Belkoura et al., 1997). Donc, les micro-algues s'adaptent aux changements de la lumière, en changeant leur profil en acides gras essentiels (Orcutt et Paterson, 1974; Sukenik et Carmeli, 1990). Les caroténoïdes sont synthétisés en abondance, lorsque le niveau de lumière est élevée, puisque ce pigment est un agent photoprotecteur (Hagen et al., 1993; Taylor, 1996; Eskling et al., 1997; Simionato et al., 2011). Les autres pigments s'ajustent en fonction du niveau d'éclairage (Gilstad et al., 1993; Thompson et al., 1993). Les travaux de Simionato et al. (2011) montrent que la concentration en chlorophylle chez *Nannochloropsis gaditana* diminue de 0,17 à 0,038 $\mu\text{g } 10^6$ cellules, lorsque l'intensité lumineuse augmente de 15 à 2100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La composition biochimique de *Chlorella sorokiniana* dépend de l'intensité lumineuse. Sous un éclairage de 140 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la biomasse algale (en matière sèche cellulaire) est composée d'environ 40 % de protéines, 30 % de glucides et 18 % de lipides (Belkoura et al., 1997). Claustre et Gostan (1987) montrent que *Hymenomonas elongata* est plus riche en glucides (362,4; 99,8 pg cellules⁻¹), en lipides (40,6; 16,8 pg cellules⁻¹) et en Chl *a* (295; 7,69 pg cellules⁻¹) sous 400 que sous 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivement. Ces mêmes auteurs constatent que *Isochrysis galbana* est moins riche en composés biochimiques par rapport à *Hymenomonas elongata*, mais ils enregistrent également une diminution en glucides (6,68; 1,88 pg cellules⁻¹), en lipides (4,08; 2,9 pg cellules⁻¹) et en Chl *a* (0,162; 0,505 pg cellules⁻¹) sous 400 par rapport à 25 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La concentration en protéines (3 pg cellule⁻¹), en glucides (0,8 pg cellule⁻¹) et en lipides (2,5 pg cellule⁻¹) atteignent leur maximum chez *Nannochloropsis gaditane* lorsque les cellules sont exposées à 6, 8 et 12 h de luminosité (Fabregas et al., 2002). Belkoura et al. (1997) postulent qu'il est possible d'orienter le métabolisme cellulaire des micro-algues vers la production des métabolites souhaités en choisissant les conditions environnementales appropriées (la lumière) au moment de la récolte de la biomasse algale. Ainsi, les changements rapides en pigments et en composés biochimiques sont une réponse adaptative des cellules aux changements d'éclairage (Sukenik et Carmeli 1990).

Objectifs



Objectifs de ce travail

Cette thèse s'inscrit dans la continuité des travaux consacrés à l'étude de la saline de Sfax depuis les années 2000 par notre laboratoire de planctonologie UR/11ES72 (Ayadi et al., 2002, 2004; Toumi et al., 2005; Abid et al., 2008; Elloumi et al., 2008 ; 2009; Khemakhem et al., 2010; Kobbi-Rebai et al., 2013). L'ensemble de ces travaux vise à mieux comprendre le fonctionnement du phytoplancton dans son écosystème d'une part, et dans des conditions strictes de laboratoire, en utilisant différentes approches.

Dans une **première partie**, les facteurs abiotiques contrôlant la répartition des espèces phytoplanctoniques de ce milieu ayant une salinité croissante et la composition floristique seront mesurés tous les 15 jours, pendant une année (Juin 2010 à Mai 2011, à l'exception des mois de Janvier et Février 2010), en mettant l'accent sur les liens existant entre ces différents paramètres d'une part et sur la tolérance des espèces au sel d'autre part. Pour cela des analyses, comme STATICO, sont souvent utilisées dans les études écologiques (Thioulouse, 2011). Il est à noter que la saline de Sfax a fait l'objet de plusieurs études écologiques basées uniquement sur l'ACP (Ayadi et al., 2002, 2004; Elloumi et al., 2009; Abid et al., 2008; Khemakhem et al., 2010; Kobbi-Rebai et al., 2013). Cependant, les processus physiques et biologiques sont souvent corrélés entre eux, et montrent, en général, des schémas complexes de variation; d'où l'intérêt de notre étude qui utilise la méthode STATICO qui est une analyse plus structurée (Thioulouse et al., 2004).

La deuxième partie est consacrée à l'identification microscopique et moléculaire de trois espèces phytoplanctoniques, *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor*, qui appartiennent à trois classes différentes, à savoir respectivement: Chlorophyceae, Bacillariophyta et Cyanophyta. Le choix des espèces a été effectué en fonction de leur tolérance au sel. Ces trois espèces vont servir de modèles pour comprendre les mécanismes physiologiques et biochimiques de défense contre le stress salin.

La troisième partie est dédiée à la recherche d'un mécanisme de tolérance au NaCl nommé SOS (Salt Overly Sensitive). Ce système est un ensemble de protéines, dont un antiport Na^+/H^+ , impliqué dans la résistance au sel. Ce système a été mis en évidence chez les plantes terrestres (*Arabidopsis thaliana*) et partiellement identifié chez la macro-algue *Ectocarpus siliculosus*. Après recherche dans les génomes disponibles dans les banques de données (en 2010), aucune caractérisation n'a été faite chez les micro-algues et les cyanobactéries ; d'où l'intérêt de mes travaux.

La quatrième partie est consacrée à la réponse physiologique (croissance, photosynthèse, activités enzymatiques anti-oxydantes) des trois espèces, au laboratoire, en fonction de la teneur en NaCl du milieu de culture et du niveau d'éclairement. Cette étude a pour objectif d'améliorer nos connaissances concernant le comportement du phytoplancton face à une salinité croissante en plus de la lumière, car, peu de travaux se sont intéressés à ce type de stress chez ces organismes. Par ailleurs, il est, aujourd'hui, reconnu que les organismes, vivant dans des environnements extrêmes, ne sont pas uniquement des curiosités, mais forment une ressource importante pour la recherche fondamentale et appliquée, notamment en ce qui concerne l'adaptation aux conditions de vie extrêmes et la production de métabolites à haute valeur ajoutée comme les caroténoïdes. En plus, ces organismes constituent une ressource renouvelable exceptionnelle pour produire certains métabolites, comme le β -carotène qui avec d'autres anti-oxydants présentent une valeur ayant un intérêt majeur en biotechnologie. Les produits, générés par les micro-algues, peuvent être exploités à des fins thérapeutiques telles que : les maladies chroniques, l'inflammation, le vieillissement et l'exposition de la peau aux UV (Tsao et Deng, 2004).

La dernière partie est consacrée pour la valorisation d'une espèce de la saline, en comparant ses différents composés biochimiques avec des souches commerciales.

Deuxième Partie : Matériel et méthodes



Deuxième Partie : Matériel et méthodes

1. Site d'étude : La saline de Sfax

1.1. Description géographique, climatique et hydrologique de la saline

La saline de Sfax ou saline de Thyna (Fig. 19 et 20) est un système artificiel situé dans le golfe de Gabès sous un climat aride ($34^{\circ} 39'N$ et $10^{\circ} 42'E$) (Abid, 2009; Kobbi-Rebai et al., 2013). Ce système est composé de plusieurs bassins interconnectés de faible profondeur (20 à 70 cm de profondeur) avec des salinités croissantes depuis la prise d'eau (40 p.s.u) jusqu'aux tables salantes (450 p.s.u) (Khemakhem et al., 2010). La saline est séparée de la mer par un barrage de limon rouge d'environ 4 m de hauteur (Abid, 2009) et longe la côte méridionale de la ville de Sfax sur environ 13 Km, depuis la zone portuaire jusqu'au village de Gargour, en occupant une superficie de 1500 ha (Fig. 19; Kobbi-Rebai et al., 2013). C'est l'une des plus importantes zones de production de sel en Tunisie (300 000 T de sel par an ; Abid et al., 2008). La saline de Sfax est traversée par l'oued El Maou, par un canal issu de l'Office National d'Assainissement (ONAS) et un deuxième canal issu de la société industrielle d'acide phosphorique et d'engrais (SIAPE) (Elloumi, 2006) (Fig. 20). Toutefois, les études géochimiques (Amdouni, 1987) et biologiques (Ayadi et al., 2002 et 2004; Toumi et al., 2005; Elloumi et al., 2009; Trigui et al., 2011) des différents bassins montrent que les sels produits sont de très bonne qualité et que la biocénose n'est pas détériorée (ISO, 9002 ; ISO, 14000 ; Amdouni, Communication personnelle).

La saline de Thyna est classée comme site RAMSAR (La Convention sur les zones humides d'importance internationale, particulièrement les habitats sauvages). C'est une importante réserve d'oiseaux (Important Bird Area : IBA) puisqu'elle se trouve au carrefour des plus importantes voies de migration des oiseaux qui viennent de l'Europe et de l'Afrique sub-saharienne, et elle est le site de résidence pour plusieurs espèces d'oiseaux aquacoles (Ramírez et al., 2011). L'attraction de diverses populations avifaunes (sédentaire, hivernante et nicheuse) est due à la spécificité physicochimique naturelle de cette zone : basse topographie, phénomène de marnage, constance du niveau de l'eau, stock macro benthique et nutritionnel suffisant et riche, faible amplitude thermique, zone à l'abri des vents froids nordiques (Rapport TUN/G52/05, Chaker et al., 2000).

La région de Sfax est caractérisée par une moyenne annuelle des précipitations voisines de 200 mm sous forme d'averses violentes irrégulières. Cette région souffre de la sécheresse (Daoud et Dahech, 2012). La température moyenne calculée de l'air sur une période de 11 ans (2002-2013, au niveau de la station Sfax-Thyna) est variable de 14 °C à 31 °C selon les saisons et en moyenne de 22 °C. Le mois le plus froid étant janvier et les plus chauds, juillet et août (www.windfinder.com). Lorsque le vent de type Sirocco souffle, la température de l'air peut alors dépasser 40 °C (Dahech et al., 2007).

Les vents favorisent le transport des éléments fins d'origine terrigène, favorisent l'évaporation, et créent des courants locaux, favorisant l'hydrodynamisme de la lagune et la remise en suspension des particules sédimentaires. Les données statistiques des vents pour le littoral de la région de Sfax-Thyna, sur une période de 11 ans (2002-2013), montrent la prédominance de vents de directions E-SE/N-NW (www.windfinder.com).

Le rayonnement global journalier (quantité d'énergie solaire interceptée par une surface horizontale) varie entre 94,2 et 297,1 J/cm² avec une moyenne égale à 194,56 J/cm². L'insolation ou la durée d'ensoleillement, exprimée en heures (durée d'exposition d'un site au Soleil) varie entre 11 et 133 h, avec une moyenne égale à 86 h. Il est à noter que ces valeurs sont prélevés du 15-6-2010 au 25-5-2011 à partir de l'archive de la station météorologiques Thyna-Sfax.

La saline de Sfax, comme les autres marais salants, possède une hydrologie artificielle fixée par les sauniers qui ajustent les transferts d'eau d'un partènement à l'autre, en fonction des conditions météorologiques. Elle peut subir deux types de régimes : un régime continu dans les partènements, dont le but est de produire le maximum de saumures en fonction de la météorologie. Ceci tente de favoriser une compensation de l'évaporation, tout en maintenant les densités depuis la prise d'eau de mer jusqu'aux pièces maîtresses ; un deuxième régime continu sur les tables salantes consiste à compenser les évaporations des tables par les saumures saturées des pièces maîtresses (Elloumi, 2006 ; Abid, 2009).

L'implantation et l'extension de la saline ont été favorisées par la présence d'une balance hydrique largement déficitaire, les conditions météorologiques étant souvent optimales pour l'évaporation (faible pluviosité, vent fort et constant). Les eaux suivent des cheminements bien déterminés et les sels se concentrent progressivement, de sorte qu'un gradient de salinité stable (40 à 400 p.s.u.) couvre l'ensemble des surfaces évaporatoires de la saline (Elloumi, 2006; Abid, 2009).

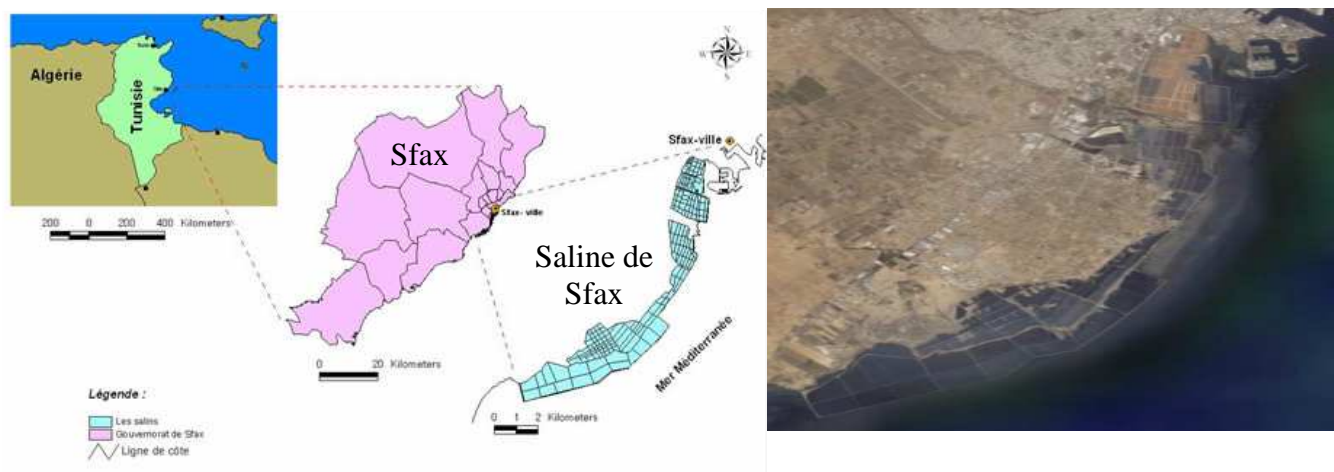


Figure 19. Carte et photographie satellite du site d'étude : la saline de Sfax

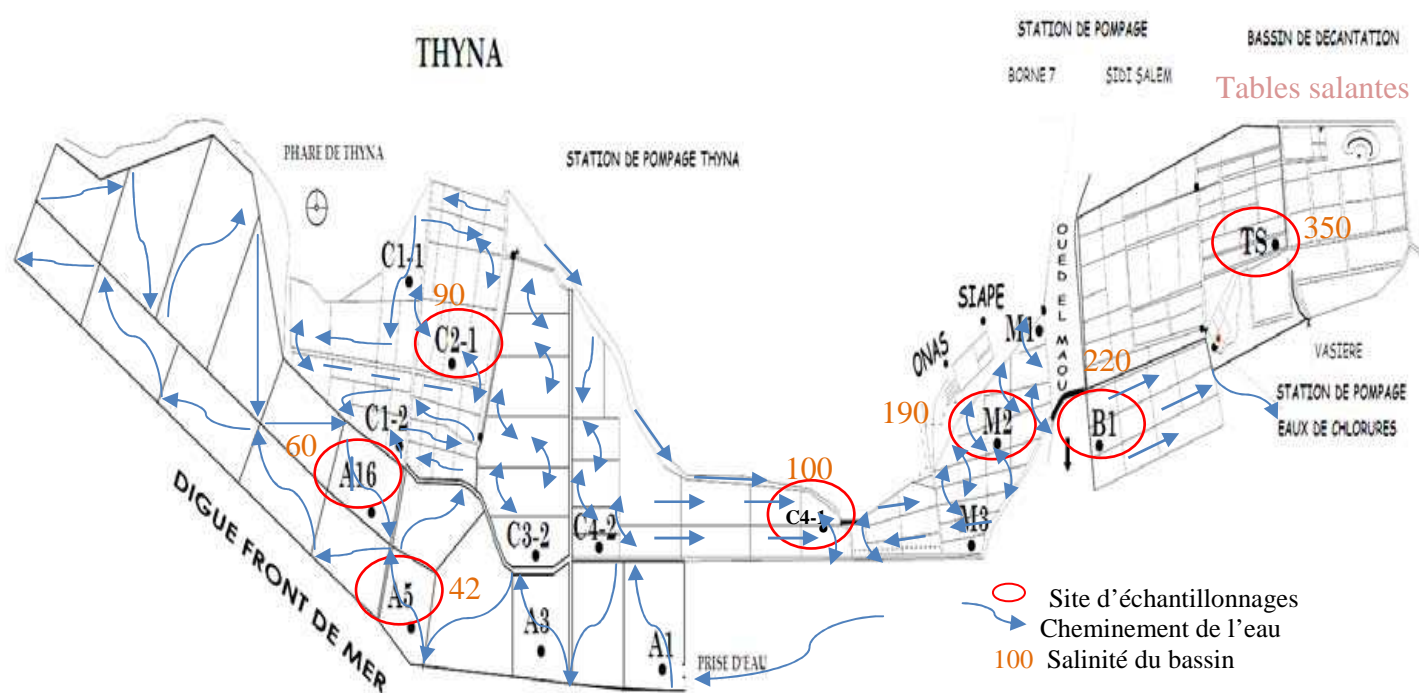


Figure 20. Schéma représentant les différents partènements de la saline de Sfax et montrant l'hydrodynamisme des eaux (Elloumi, 2006)

1.2. Echantillonnage

De Juin 2010 à Mai 2011, des échantillons d'eau ont été prélevés à l'aide d'une bouteille fermante d'un volume de 1L dans les bassins A5, A16, C21, C41, M2, B1 et TS. Seulement l'eau de surface à environ 1 m du bord a été prélevée dans les bassins A5 à C41, l'expérimentateur restant sur le chemin bordant ces bassins. Pour les bassins M2 à TS, les échantillons d'eau ont été prélevés à environ 50 m du bord où la profondeur d'eau est d'environ 50 cm. Un seul échantillon a été prélevé tous les 15 jours dans chacun des bassins.

1.3. Paramètres mesurés

1.3.1. Paramètres abiotiques

1.3.1.1. Température, salinité, l'oxygène dissous, densité de l'eau et pH

La température est mesurée *in situ* à l'aide d'un thermomètre de terrain gradué en °C. La mesure est réalisée à 20 cm en dessous de la surface de l'eau dans chaque bassin.

Une fois au laboratoire, la salinité des saumures, en %, a été évaluée à l'aide d'un réfractomètre de type ZUZI. La teneur en oxygène dissous a été calculée selon l'équation de Scherwood et al. (1992).

La densité de l'eau, quant à elle, a été évaluée par la technique de pesée. La masse d'un volume ($V = 50$ ml) connu de saumure permet de calculer la densité selon l'équation suivante :

$$\text{Densité} = (P2 - P1) / V \times 1000$$

P1 : Poids du cristalliseur vide

P2 : Poids du cristalliseur avec

(V) ml d'eau du bassin

Enfin, la mesure du pH est effectuée au laboratoire à l'aide d'un pH-mètre de type Met Röhm. L'incertitude sur les mesures du pH est de 0,1 et peut atteindre 0,2 U de pH pour des solutions très concentrées en sel.

1.3.1.2. Matières en suspension (MES)

Un volume d'eau de chaque bassin, allant de 50 mL pour les tables salantes jusqu'à 200 mL pour les premiers bassins, est filtré sur du papier Whatman GF/C de porosité 0,45 µm. Après filtration sous vide, les filtres sont mis à l'étuve pendant une heure à 120 °C. Les concentrations en MES, exprimées en mg L⁻¹, sont calculées par différence de masses du filtre avant et après filtration suivant la formule suivante :

$$\text{MES} = \frac{(M1 - M0)}{V} \times 1000$$

$\left\{ \begin{array}{l} M0 = \text{masse initiale du disque filtrant (mg)} \\ M1 = \text{masse finale (disque filtrant + matière retenue) (mg)} \\ V = \text{Volume de l'échantillon à analyser (ml)} \end{array} \right.$

1.3.1.3. Dosage des éléments nutritifs

Le dosage des éléments nutritifs est effectué par une chaîne d'analyse automatique colorimétrique (Bran-Luebbe Autoanalyseur 3). Quatre analyses indépendantes ont été effectuées par cet autoanalyseur : les nitrates, les nitrites, les phosphates organiques et l'ion ammonium. La chaîne d'analyse automatique permet une analyse rapide et précise de ces éléments.

1.3.2. Paramètres biotiques

1.3.2.1. Le phytoplancton

Des échantillons de 200 mL sont fixés avec du lugol (conc. finale: 1 % V/V) (Bourrelly, 1966). Le dénombrement du phytoplancton a été effectué sur des échantillons de 10 à 20 mL à l'aide d'un microscope inversé Leica, conformément à la méthode d'Uthermöhl (1958). L'identification des espèces a été faite à partir de critères morphologiques après l'utilisation des livres d'identification de Sournia (1986), Ricard (1987) et Chrétiennot-Dinet (1990). La diversité phytoplanctonique (H') a été estimée à l'aide de l'indice de Shannon-Weaver (Shannon et Weaver, 1949). Les espèces phytoplanctoniques présentent également une très grande diversité de formes (Carrias, 1996). Pour chaque espèce du phytoplancton, un biovolume moyen est estimé en mesurant les longueurs et les largeurs des cellules à l'aide d'un micromètre oculaire et en assimilant ces dernières à des formes géométriquement calculables (Hillerbrand et al., 1999; Vadrucchi et al., 2007). En outre, les communautés phytoplanctoniques sont dotées d'une tolérance optimale et spécifique pour certains

paramètres environnementaux tels que le pH, la salinité, la température, les nutriments et la disponibilité de la lumière qui sont des indicateurs particulièrement utiles (Lim et al., 2001; Resende et al., 2005). En ce qui concerne la salinité, les halophiles, au sens large, sont les organismes capables de vivre dans des environnements, tels que les marais salants hyper-salés naturels ou artificiels. Le phytoplancton halophiles comprend principalement des micro-organismes procaryotes comme *Aphanothece halophytica* et des micro-organismes eucaryotes comme *Dunaliella salina*, qui ont la capacité d'équilibrer la pression osmotique et de résister à l'effet dénaturant du sel (Oren, 2009). Le phytoplancton sténohaline regroupe les espèces incapable de gérer les fortes fluctuations de la teneur en sel de l'eau comme les Dinophyceae: *Gymnodinium* sp., *Protoperidinium* sp., *Gonyaulax* sp. et *Oxyrhis marina* (Abid et al., 2008). Les espèces vivant en eau saturé en sel peuvent être des halophiles, au sens strict, car elles nécessitent une concentration de NaCl donnée, ou seulement halotolérante (Larsen, 1986; Chatchawan et al., 2001). Elles peuvent être également classées comme légèrement, modérément ou très halophile, en fonction de leur exigence / tolérance au NaCl (Larsen, 1986; DasSarma et Arora, 2001). Dans notre cas d'étude, nous avons tenté de déterminer la salinité optimale (UK) et la tolérance (tk) pour chaque espèce échantillonnée au moins 5 fois, selon l'équation de Resende et al. (2005):

$$(k) = \sum_{i=1}^n yikxi / \sum_{i=1}^n yik; (tk) = (\sum_{i=1}^n yik(xi - k)^2 / \sum_{i=1}^n yik)^{1/2}$$

1.3.2.2. Dosage des pigments photosynthétiques

Un volume d'eau prélevé dans chaque bassin (selon le colmatage du filtre) est filtré sur un disque Whatman de porosité 0,45 µm afin de récupérer le phytoplancton.

Le filtre recouvert de la biomasse est ensuite broyé dans 10 mL d'acétone 90 %. L'extraction est effectuée à l'obscurité à une température de l'ordre de 4 °C pendant 4 h. Pour éliminer les débris cellulaires, l'extrait pigmentaire est ensuite centrifugé à 3 000 g pendant 10 min à 4 °C. L'acétone 90 % a été utilisée comme blanc pour l'étalonnage du spectrophotomètre. L'absorbance du surnageant est mesurée par spectrophotométrie.

Les concentrations en chlorophylle *a*, *b*, *c* sont calculées selon les équations de Jeffrey et Humphrey (1975) et les caroténoïdes selon l'équation de SCOR-UNESCO (1966) pour un mélange de phytoplankton :

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = 11,85\text{DO}_{664\text{nm}} - 1,54\text{DO}_{647\text{nm}} - 0,08\text{DO}_{630\text{nm}}$$

$$\text{Chl } b \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = -5,43\text{DO}_{664\text{nm}} + 21,03\text{DO}_{647\text{nm}} - 2,66\text{DO}_{630\text{nm}}$$

$$\text{Chl } c \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = 1,67\text{DO}_{664\text{nm}} - 7,60\text{DO}_{663\text{nm}} + 24,52\text{DO}_{630\text{nm}}$$

$$\text{Caroténoïde (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = 10(\text{DO}_{480\text{nm}} - 3\text{DO}_{750\text{nm}}) v / (L V)$$

Avec

DO: Densité optique

v: volume de l'extrait acétonique (mL)

V : volume d'eau filtré (mL)

L : longueur du trajet optique (cm)

2. Etude de la réponse physiologique et biochimique des trois microorganismes cultivés

Une Chlorophycée : *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905), une diatomée (Bacillariophyceae): *Cylindrotheca closterium* (Reimann and Lewin, 1964) et une cyanobactérie : *Phormidium versicolor* (Wartmann, 1861) ont été isolées à partir des bassins de la saline de Sfax nommées TS, C41 et C21. Ces bassins ont des salinités moyennes de l'ordre de 350, 100 et 90 respectivement. *C. closterium* a été isolée à l'aide d'un capillaire; *D. salina* et *P. versicolor* ont été isolés sur milieu gélosé. Plusieurs traitements antibiotiques et antifongiques ont été effectués (biowest antibiotic – antimycotic mix “A5955”, Sigma-Aldrich: 10000 unités mL^{-1} pénicilline G, 10 mg mL^{-1} sulfate de streptomycine, 25 mg mL^{-1} amphotéricine B) afin d'obtenir des cultures monoclonales et axéniques.

2.1. Conditions de culture au laboratoire

Les deux micro-algues et la cyanobactérie ont été cultivées en batch dans des fioles Erlenmeyer de 500 mL avec de l'eau de mer artificielle (EMA, Harrison et al., 1980, annexe 1) à trois concentrations en NaCl 40, 80 et 140 g L^{-1} . Les cultures ont été initiées avec des densités cellulaires de 10^6 cellules mL^{-1} pour *D. salina*, 50 000 cellules mL^{-1} pour *C. closterium* et une concentration initiale de chlorophylle *a* de 0,005 μg de Chl *a* mL^{-1} pour *P. versicolor* car la numération était impossible (les filaments s'entrelacent). Les cultures sont soumises à un éclairage de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E300, E500 et E1000)

avec une photopériode de 14 h jour / 10 h nuit et à une température de $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Les niveaux d'éclairement ont été mesurés avec une sonde quantamétrique 4π immergée dans le milieu de culture et un quantamètre (LI-COR® LI-250A).

2.2. Suivi de la croissance

2.2.1. La densité cellulaire

Afin de déterminer la densité cellulaire des cultures des deux micro-algues, l'hématimètre Neubauer a été utilisé. Le quadrillage comporte neuf grands carrés subdivisés chacun en 16 petits carrés. Les cellules ont été comptées dans quatre grands carrés. La superficie de la zone quadrillée est de 9 mm^2 et la profondeur est de 0,1 mm. Un grand carré a donc un volume de $0,9 \text{ mm}^3$. La densité cellulaire est calculée comme suit :

Densité cellulaire (cellules mL^{-1}) = Nombre moyen de cellules dans un grand carré $\times 10\,000$

La cyanobactérie étant filamenteuse, il est donc impossible de compter le nombre de cellules. Le dosage de la chlorophylle *a* a été effectué pour évaluer la croissance de la cyanobactérie selon l'équation de Speziale et al. (1984) :

$$\text{Chl } a (\mu\text{g L}^{-1}) = [11,47 (\text{DO}_{664\text{nm}} - \text{DO}_{750\text{nm}}) - 0,4 (\text{DO}_{664\text{nm}} - \text{DO}_{750\text{nm}})] v / V$$

Avec

DO: Densité optique

v: volume de l'extrait acétonique (ml)

V : volume de la suspension d'algue (ml)

2.2.2. Courbes de croissance

Les courbes de croissance de *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor* ont été établies en fonction du temps pour les trois salinités. La variation de la densité cellulaire en fonction du temps pour la culture en discontinue se traduit par une courbe de forme sigmoïdale (S) (Fig. 21). A partir de cette courbe, plusieurs paramètres ont pu être estimés, à savoir le taux de croissance spécifique $\mu = (\text{Log } N_2 - N_1) / T_2 - T_1$ et le temps de doublement $G = \mu / \text{Log } 2$ exprimé en j^{-1} pendant la phase exponentielle de croissance et la densité cellulaire maximale (Y_{max}) pendant la phase stationnaire.

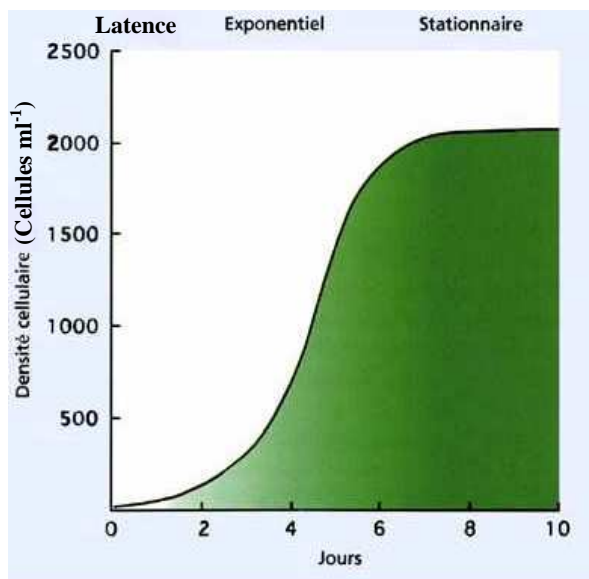


Figure 21. Courbe de croissance théorique de micro-organismes cultivés en « batch » en fonction du temps.

2.2.3. Dosage des pigments photosynthétiques et estimation de la taille des antennes

Le dosage des pigments photosynthétiques est effectué après une extraction dans l'acétone 90 % selon le protocole cité ci-dessus. Vingt mL pour *D. salina* et *C. closterium* et 10 mL pour *P. versicolor* de culture homogénéisée par agitation sont filtrés sur un filtre GF/C (Whatman) afin d'éliminer le milieu de culture. Les concentrations en Chl *a*, *b* et *c* sont calculées selon l'équation de Speziale et al. (1984) pour la cyanobactérie, selon les équations de Jeffrey et Humphrey (1975) pour la Chlorophycée *D. salina* et la diatomée *C. closterium*.

–Equation de Jeffrey et Humphrey (1975) pour les Chlorophycées

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = 11,93\text{DO}_{664\text{nm}} - 1,93\text{DO}_{647\text{nm}}$$

$$\text{Chl } b \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = 20,36\text{DO}_{647\text{nm}} - 5,50\text{DO}_{664\text{nm}}$$

–Equation de Jeffrey et Humphrey (1975) pour les diatomées

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = 11,47\text{DO}_{664\text{nm}} - 0,40\text{DO}_{630\text{nm}}$$

$$\text{Chl } c \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = 24,36\text{DO}_{630\text{nm}} - 3,730\text{DO}_{664\text{nm}}$$

Les concentrations en caroténoïdes sont calculées selon l'équation de Chamovitz et al. (1993) pour la cyanobactérie et selon Salguero et al. (2003) pour la Chlorophycée.

- Equation de Chamovitz et al. (1993) pour les cyanobactéries

$$\text{Caroténoïde } (\mu\text{g L}^{-1}) = (\text{DO}_{461\text{nm}} - 0,046\text{DO}_{664\text{nm}}) \times 4$$

- Equation de Salguero et al. (2003) pour les Chlorophycées

$$\text{Caroténoïdes } (\mu\text{g L}^{-1}) = 0,0045 (3000\text{DO}_{470\text{nm}} - 1,63\text{DO}_{750\text{nm}} \text{ Chl } a)$$

La concentration en fucoxanthine a été indirectement calculée comme suit (Huang, 2013) :

$$\text{Fucoxanthine } (\mu\text{g L}^{-1}) = \frac{[(\text{DO}_{443\text{nm}} - \text{DO}_{750\text{nm}}) - \text{Chl } a \ \varepsilon_{\text{Chl } a} \text{ R}_{\text{Chl } a} - \text{Chl } c \ \varepsilon_{\text{Chl } c} \text{ R}_{\text{Chl } c}]}{\varepsilon_{\text{Fucoxanthine}} \text{ L}}$$

Avec

$\varepsilon_{\text{Chl } a}$ = coefficient d'extinction massique pour la Chl *a* dans l'acétone à 663 nm, soit $88,15 \times 10^{-3} \text{ L mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$\text{R}_{\text{Chl } a}$ = Rapport d'absorbance pour la Chl *a* dans l'acétone entre 443nm et 663 nm

$\text{R}_{\text{Chl } a} = 0,57$ (Huang, 2013)

$\varepsilon_{\text{Chl } c}$ = coefficient d'extinction massique pour la Chl *c* dans l'acétone à 630 nm, soit $38,2 \times 10^{-3} \text{ L mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$\text{R}_{\text{Chl } c}$ = Rapport d'absorbance pour la Chl *c* dans l'acétone entre 443 nm et 630 nm

$\text{R}_{\text{Chl } c} = 8,14$ (Huang, 2013)

$\varepsilon_{\text{Fucoxanthine}}$ = coefficient d'extinction massique pour la fucoxanthine dans l'acétone à 443 nm, soit $166 \times 10^{-3} \text{ L mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

La taille des antennes collectrices de la lumière a été évaluée en calculant les rapports Chl *a*/ Chl *b* chez *D. salina* et Chl *a*/ Chl *c* chez *C. closterium* (Baroli et Melis, 1998; Melis, 2009; Perrine et al., 2012).

2.2.4. Dosage des protéines totales

La méthode de dosage des protéines utilisée est celle de Lowry et al. (1951). Le principe de cette méthode est basé sur la complexation entre les ions Cu^{2+} et les liaisons peptidiques. Ce complexe est ensuite coloré par la présence du réactif de Folin qui absorbe fortement à 700 nm. Cette coloration est proportionnelle à la concentration en protéines présentes dans l'extrait. La courbe d'étalonnage est établie en parallèle avec une gamme de concentrations d'albumine bovine (BSA). La gamme étalon est préparée à partir d'une

solution mère (5 mg L^{-1}) diluée au 1/10. A partir de cette solution, un ensemble de solutions ayant des quantités de BSA qui varient entre 10 et 200 μg , sont préparées pour établir la courbe. Il est alors possible de déterminer par spectrophotométrie la quantité de protéine (mg L^{-1}) en mesurant l'absorbance du complexe formé à 700 nm. 20 mL de culture filtrée sont suffisants pour ce dosage.

2.3. Mesure de la photosynthèse

Dans cette étude, la photosynthèse a été mesurée par oxymétrie et fluorimétrie modulée.

2.3.1. Oxymétrie

L'un des moyens les plus utilisés, pour suivre l'évolution de la photosynthèse et de la respiration, est de mesurer le dégagement ou l'absorption de dioxygène produit au cours de ces réactions. Pour cela, le dégagement de O_2 est mesuré grâce à une électrode à oxygène, appelée aussi électrode de Clark, couplée à un oxymètre (Hansatech LTD, UK). Cette électrode est constituée d'une cathode en platine et d'une anode en argent. Une solution saturée de KCl permet d'assurer un pont électrolytique entre ces deux électrodes (Fig. 22). Si une différence de potentiel de 0,80 volt (correspondant au potentiel d'oxydoréduction du O_2) est appliquée, la cathode en platine ayant un potentiel négatif, les réactions chimiques suivantes se produiront (1, 2, 3) :

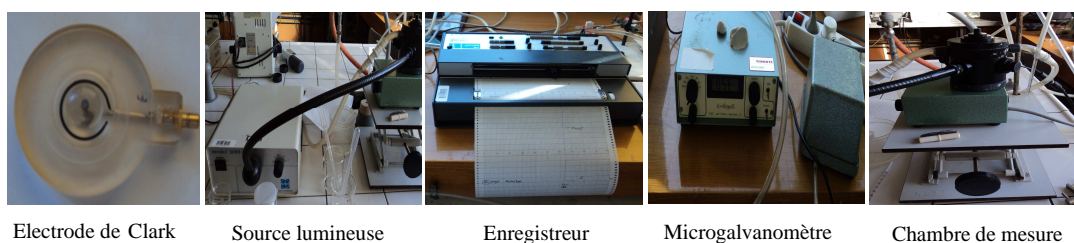
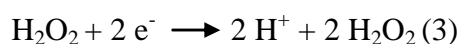
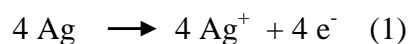


Figure 22. Les différents composants du dispositif de mesure de la photosynthèse et de la respiration par oxymétrie.

L'intensité du courant passant dans l'électrode sera proportionnelle à la quantité d'O₂ présent. L'électrode est isolée de la solution à analyser par une fine membrane perméable à l'oxygène. L'O₂ est consommé au niveau de la cathode (réaction 2). La suspension cellulaire est agitée à l'aide d'un agitateur magnétique afin de maintenir une concentration constante en O₂ proche de l'électrode.

Le calibrage de l'oxymètre est effectué en utilisant de l'eau de mer artificielle à 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl. Après élimination de l'O₂ de l'eau de mer par bullage d'azote et ajustement du zéro, le milieu est ensuite saturé en O₂ dissous par bullage d'air atmosphérique. La salinité et la température sont des paramètres qui affectent la concentration maximale en O₂ dissous dans l'eau. Lorsque la salinité de l'eau augmente, sa capacité à dissoudre l'O₂ diminue. La teneur maximale en O₂ a été calculée selon l'équation de Scherwood et al. (1992). A 24 °C, cette teneur est de 6,71 mg L⁻¹ ; 5,32 mg L⁻¹ ; 3,67 mg L⁻¹ pour l'EMA renfermant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl respectivement.

L'enceinte de mesure de l'oxymètre renferme 1,5 mL de suspension d'algue lors des mesures. Cette enceinte de mesure est partiellement fermée dans sa partie supérieure par un capillaire réduisant au maximum le contact avec l'O₂ atmosphérique. La suspension de micro-organismes est agitée tout au long des mesures par un micro barreau aimanté pour maintenir la teneur en O₂ homogène dans la cellule de mesure.

Les 3 microorganismes sont exposés aux 3 niveaux d'éclairements (E300, E500 et E1000) par une lumière froide (lampe Intralux Volpi, Suisse) et sont maintenus à 24 °C ± 1 °C par circulation d'eau thermostatée dans la double paroi de la chambre de mesure. L'électrode à oxygène est connectée à un micro-galvanomètre qui affiche l'intensité du courant électrique en mV, proportionnelle à la quantité de O₂ présent dans l'enceinte (1 mg O₂ L⁻¹ = 100 mV). L'évolution de la teneur en O₂ dans la cellule de mesure est enregistrée sur papier grâce à un enregistreur connecté au boîtier de l'oxymètre. A partir des pentes des courbes enregistrées, l'activité photosynthétique (mg O₂ L⁻¹ min⁻¹) a été déterminée (AP). L'intensité photosynthétique (IP) a ensuite été calculée à l'aide de la relation suivante:

$$IP = \frac{AP \cdot 60 \cdot 10^3}{32 \cdot [Chl\ a]}$$

IP, intensité photosynthétique en μmol O₂ h⁻¹ mg⁻¹ Chl *a*

AP, activité photosynthétique en mg O₂ L⁻¹ min⁻¹

[Chl *a*], teneur en Chl *a* (mg L⁻¹)

60, conversion en heure; 10³, conversion des mg en µg d'O₂; 32, masse molaire de O₂

La respiration a été mesurée en suivant le même protocole mais avec les échantillons placés à l'obscurité.

2.3.2. Fluorimétrie modulée

La fluorimétrie modulée est une technique non intrusive qui fournit des informations rapides, fiables et reproductibles sur l'appareil photosynthétique (Maxwell et Johnson, 2000; Elfving et al., 2003) et plus particulièrement sur le PS II. En effet, il a été constaté qu'à température ambiante, la fluorescence de la chlorophylle est due essentiellement à la Chl *a* associée au PSII. Quand une molécule de Chl *a* capte un photon, elle passe d'un état fondamental stable à un état excité. La chlorophylle excitée se désactive spontanément par fluorescence, par dissipation thermique ou encore par photochimie. La somme de ces trois voies de dé-excitation est constante et égale à 1. Le principe de la fluorimétrie modulée est basé sur l'utilisation d'une source de lumière de faible puissance et émise sous forme d'un signal modulé. Cette lumière modulée ou lumière analytique produite par des diodes électroluminescentes (LED) est couplée à un système récepteur permettant de mesurer et d'enregistrer les variations du signal de fluorescence de même fréquence émise par les algues (Fig. 23). Dans ces conditions, la lumière actinique induisant la photosynthèse n'influence pas la détection de la fluorescence. Le fluorimètre FMS-1 (Hansatech) a été modifié par Rech et al. (2003) et utilisé avec succès pour effectuer des mesures sur des suspensions de micro-algues. Cet appareil possède deux sources lumineuses : actinique (LA) et analytique (LM). La source de lumière actinique (lumière blanche, lampe Osram 8 V, 20 W), dont l'intensité est variable, est utilisée pour activer la photosynthèse. La lumière modulée est émise par une diode bleue au gallium (Nichia NSPB-500S) pour induire la fluorescence qui est ensuite captée par une photodiode réceptrice. La lumière actinique (E300, E500 et E1000) est conduite par une fibre optique à l'échantillon placé dans une cuve en verre bi-miroitée située au croisement des guides optiques des lumières émettrice et réceptrice. L'échantillon est agité par un barreau aimanté, placé dans la cuve pour assurer l'homogénéité de la suspension. L'enceinte de mesure est thermo-régulée à 24 °C ± 1 °C. L'acquisition des données est effectuée automatiquement et en continu par un ordinateur connecté au fluorimètre. Avant toute mesure de fluorescence, une période d'adaptation à l'obscurité des cultures est appliquée pendant 10 minutes. Cette période est nécessaire pour une ré-oxydation complète des

accepteurs d'électrons des PSII. Le premier paramètre mesuré est la fluorescence minimale (F_0). Ce paramètre correspond à une fluorescence résiduelle, induite par le turn-over continu des quelques centres réactionnels que le faisceau modulé parvient à réduire (position fermé) ainsi que par celle des centres réactionnels bloqués en position fermée. La plupart des centres sont ouverts (oxydés) car photosynthétiquement actifs, la fluorescence est donc faible. L'action d'un flash saturant induit la réduction temporaire des accepteurs d'électrons du PSII, inhibant transitoirement la photochimie au niveau des centres réactionnels. Ces derniers sont alors fermés temporairement, donc photosynthétiquement inactifs. Il en résulte alors une fluorescence maximale notée F_m . Ces deux paramètres peuvent nous renseigner sur la fluorescence variable F_v correspondant à la fraction des centres réellement actifs. Le rapport F_v/F_m correspond au rendement quantique maximum du PSII. La fluorescence stabilisée F_s est mesurée lorsque la suspension d'algue est acclimatée à la lumière. L'émission d'un flash saturant permet de déterminer la fluorescence maximale d'un échantillon adapté à la lumière (Fig. 24). A partir de ces paramètres, le rendement quantique effectif du PSII est calculé selon l'équation suivante:

$$\Phi_{PS II} = \frac{F'_m - F_s}{F'_m}$$

On peut calculer l'atténuation de la fluorescence (ou quenching) par la photochimie (qP) et le quenching non-photochimique (QNP). Le qP est proportionnel au nombre de centres réactionnels restés ouverts et participant au transport des électrons. Il est calculé comme suit:

$$qP = \frac{F'_m - F_s}{F'_m - F'_o}$$

Le QNP caractérise la dissipation thermique de l'énergie d'excitation en concurrence avec l'utilisation de l'énergie pour les réactions photochimiques. Ce paramètre est influencé par différents mécanismes biochimiques associées aux membranes thylakoïdales : cycle des xanthophylles (Demmig-Adams et Adams, 1996); gradient de protons transthylakoïdaux; phosphorylation des protéines des antennes collectrices et photo-inhibition (Maxwell et Johnson, 2000; Mallick et Mohn, 2003) :

$$QNP = \frac{F_m - F'_m}{F'_m}$$

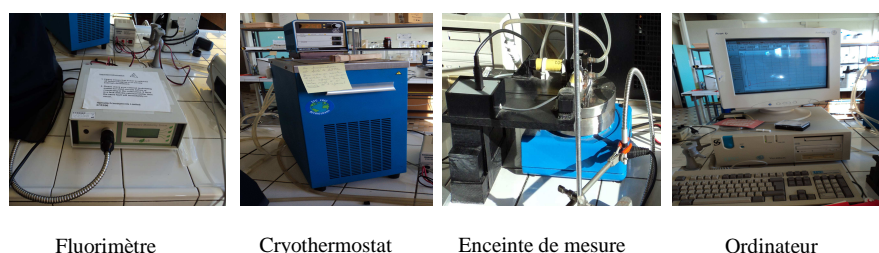


Figure 23. Appareillages composant le dispositif de mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* des micro-algues.

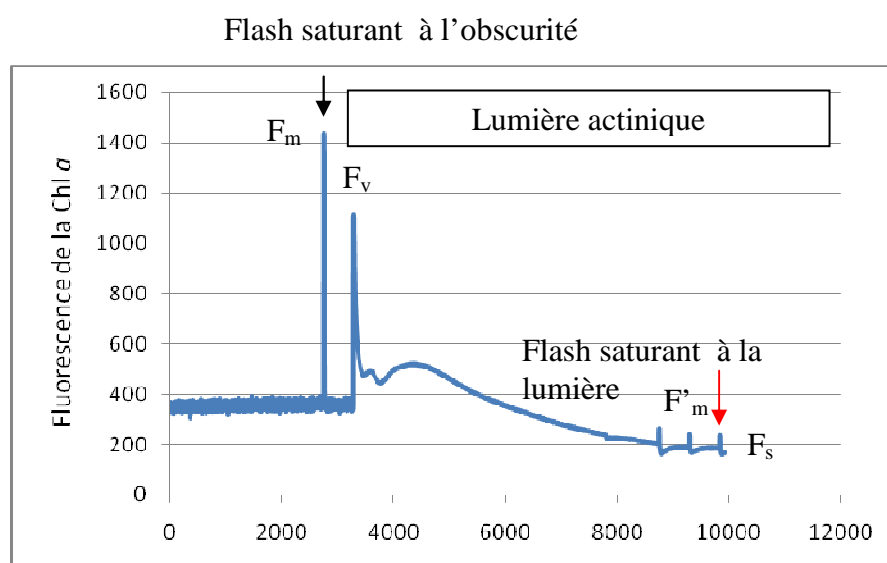


Figure 24. Exemple d'enregistrement de la fluorescence de la chlorophylle *a* de *Dunaliella salina* en fonction du régime lumineux.

2.3.3. Activités enzymatiques anti-oxydantes

Au cours de cette étude, l'activité de trois enzymes antioxydantes a été mesurée par spectrophotométrie chez *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor* pendant la phase exponentielle de croissance aux trois salinités (NaCl 40, 80 et 140 g L⁻¹).

2.3.3.1. Extraction des protéines

Un volume de 300 mL de culture de micro-algues a été centrifugé pendant 15 à 30 min à 900 g et 4 °C avec une accélération et décélération ménagées. Le culot est ensuite mis directement dans l'azote liquide. Le culot est transféré et broyé dans un mortier préalablement refroidi en présence d'azote liquide. Le culot est broyé avec 1 mL de tampon d'extraction (phosphate de sodium 50 mM pH 7, EDTA-Na₂ 1 mM, acide ascorbique 1 mM). Ensuite il est centrifugé (10 000 g, 10 min, 4 °C) pour éliminer les débris cellulaires qui pourraient

perturber les mesures spectrophotométriques. Les analyses sont effectués sur le surnageant qui est conservé, au cours des mesures, dans la glace. Les culots sont gardés dans l'azote liquide et broyés juste avant de mesurer l'activité antioxydante afin de la préserver.

2.3.4. Mesure des activités enzymatiques

Il est nécessaire de doser les protéines totales des différents échantillons afin de calculer les activités enzymatiques spécifiques. La méthode de dosage des protéines utilisée est celle de Lowry et al. (1951).

2.3.4.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Le substrat de cette enzyme est l'ion superoxyde 'O_2^- qui peut réduire le bleu de nitrotétrazolium (NBT) pour donner du bleu de formazan (Beyer et Fridovich, 1987). Plus l'activité enzymatique est forte, moins le NBT est réduit car les ions superoxyde sont consommés par cette enzyme et il y a donc moins de bleu de formazan formé. Le principe de cette mesure enzymatique est donc d'estimer sa capacité à empêcher la formation du bleu de formazan dont l'absorbance est maximale à 560 nm.

Le tampon phosphate de sodium pH 7,8 contenant du NBT 5,7 mM, de la méthionine 5 mM, de l'EDTA 10 mM, 0,03 % de Triton X-100 et 100 μL d'extrait (ou 100 μL de tampon pour le témoin) sont mis dans une cuve de 1 mL et placés à 25 °C. L'ajout de la riboflavine 10 μM est réalisé juste avant de mettre le mélange réactionnel sous un fort éclairage ($600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pendant 7 min (Rijstenbil et al., 1994; Janknegt et al., 2007). Après exposition lumineuse, le mélange est agité et la DO est mesuré à 560 nm. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport au témoin (100 % de réduction de la NBT). Une unité SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour provoquer 50 % d'inhibition de l'absorption à 560 nm par rapport au témoin (absence de l'extrait).

La riboflavine et le NBT sont photosensibles : toutes les manipulations doivent être réalisées à l'abri de la lumière ambiante. Les solutions doivent être préparées au début de chaque manipulation et à l'obscurité.

2.3.4.2. Catalase (CAT)

La mesure de l'activité catalase est réalisée suivant la méthode d'Aebi (1984). Elle consiste à suivre la réduction du substrat (H_2O_2) de la catalase par spectrophotométrie à 240 nm (Geoffroy et al., 2004; Morelli et Scarano, 2004). Dans une cuve en quartz de 1 mL, le

milieu réactionnel est placé dans le spectrophotomètre thermostaté à 20 °C. Il contient du tampon phosphate 50 mM, pH 7,5 et 100 µL d'extrait. La réaction est directement mesurée pendant 1 min dès l'ajout de 100 µL de H₂O₂ 200 mM. L'activité catalase est exprimée en µmol de H₂O₂ dégradé par minute et par mg de protéines. Le coefficient d'extinction molaire de H₂O₂ à 240 nm est de 0,04 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.3.4.3. Ascorbate peroxydase (APX)

La mesure de l'activité de cette enzyme est basée sur la consommation d'ascorbate en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Nakano et Asada, 1981; Geoffroy et al., 2002, 2004; Morelli et Scarano, 2004). La cinétique enzymatique est suivie par spectrophotométrie à 290 nm pendant 3 min. La diminution de l'absorbance de l'ascorbate représente l'activité de l'APX. Pour cela, le milieu réactionnel contenant du tampon phosphate 50 mM à pH 7,5, H₂O₂ 0,5 mM et 100 µL d'extrait enzymatique est placé dans une cuve en quartz de 1 mL. L'ajout de 50 µL d'ascorbate 250 µM déclenche la réaction. L'étalonnage à 290 nm est réalisé avec le tampon contenant H₂O₂ 0,5 mM. Pour quantifier une éventuelle réaction non-enzymatique, une cinétique de dégradation de l'ascorbate par H₂O₂ est réalisée. Une unité spécifique d'APX est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour consommer une µmol d'ascorbate par mg de protéines pendant 1 min.

3. Etude moléculaire

3.1. Extraction de l'ADNg

L'ADN génomique (ADNg) a été extrait selon le protocole modifié de Doyle et Doyle (1990). Des cultures denses de micro-algues sont filtrées sous vide partiel sur un filtre GFC de porosité 0,47µm. Les filtres sont broyés en présence d'azote liquide pour obtenir une poudre à laquelle 6 mL de tampon d'extraction préalablement chauffé à 60 °C (NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM pH 8; Tris 100 mM pH 8; β-mercaptoéthanol 0,2 % v/v et CTAB 2 % m/v) sont ajoutés. Après incubation 30 min à 60 °C sous agitation, 6 mL de chloroforme sont ajoutés et le tout est mélangé pendant 5 min. La phase aqueuse supérieure obtenue après une centrifugation à 500 g pendant 20 min à 4 °C est transférée dans un nouveau tube. Un volume égal d'isopropanol est ajouté. Le mélange est incubé 3 h à -20 °C afin que les acides nucléiques précipitent. Une centrifugation de 15 min à 5 500 g et 4 °C nous permet de récupérer le culot d'acides nucléiques qui est ensuite lavé pendant 30 min sur glace en présence d'1 mL d'éthanol 70 %. Le culot est ensuite séché à l'air libre et repris dans 80 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

Pour s'assurer de la qualité de l'ADNg extrait, une migration sur gel d'agarose 1 % est effectuée et la concentration en ADNg est estimée au spectrophotomètre à 260 et 280 nm.

3.2. Identification moléculaire des trois microorganismes

Afin d'identifier au niveau moléculaire les espèces isolées de la saline de Sfax, nous avons effectué une recherche de séquences dans les banques de données sur internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) des gènes 18S, 16S, *rbcL* et 5,8S en utilisant des amorces dans les ITS pour ce dernier (Fig. 7). Les gènes 18S et *rbcL* ont été recherchés chez les deux micro-algues et le gène 16S. Ces séquences ont été alignées avec ClustalW afin d'identifier des zones conservées permettant de désigner des amorces spécifiques ou dégénérées (Tableau 1). L'ADNg des micro-algues a été amplifié avec ces amorces par la technique de « Polymerase Chain Reaction » ou PCR. Les amorces utilisées ont été désignées sur les alignements de séquences à partir de l'ATG et du codon stop, ou plus internes (Fig. 25, 26), et des amorces dites chevauchantes (Nested) ont aussi été commandées afin d'optimiser les chances de cibler le gène d'intérêt. Les PCR sont effectuées en utilisant le mélange réactionnel suivant : 1X tampon *taq*, 0,2 μ M dNTP, 2,5 mM $MgCl_2$, chacune des amorces à 0,2 μ M, 0,6 unités *Taq* polymérase et 100 ng d'ADNg. Le volume final du mélange réactionnel est égal à 25 μ L. Les cycles PCR d'amplification se sont déroulés après une première dénaturation de 3 min à 94 °C puis 35 cycles composés de 30 s à 94 °C ; 1 min à la température d'hybridation et 1 à 2 min à 72 °C sont nécessaires pour l'élongation. La PCR se termine par une incubation de 10 min à 72 °C afin de boucler l'élongation terminale.

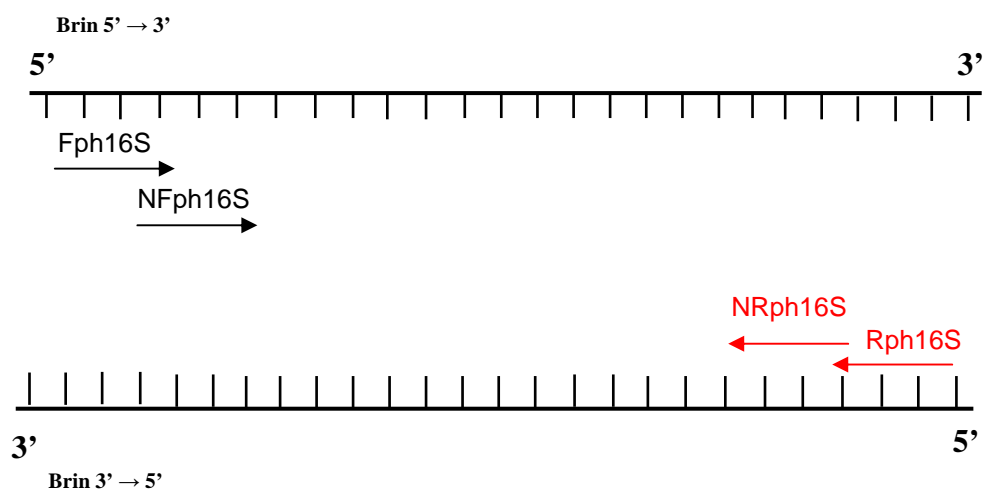
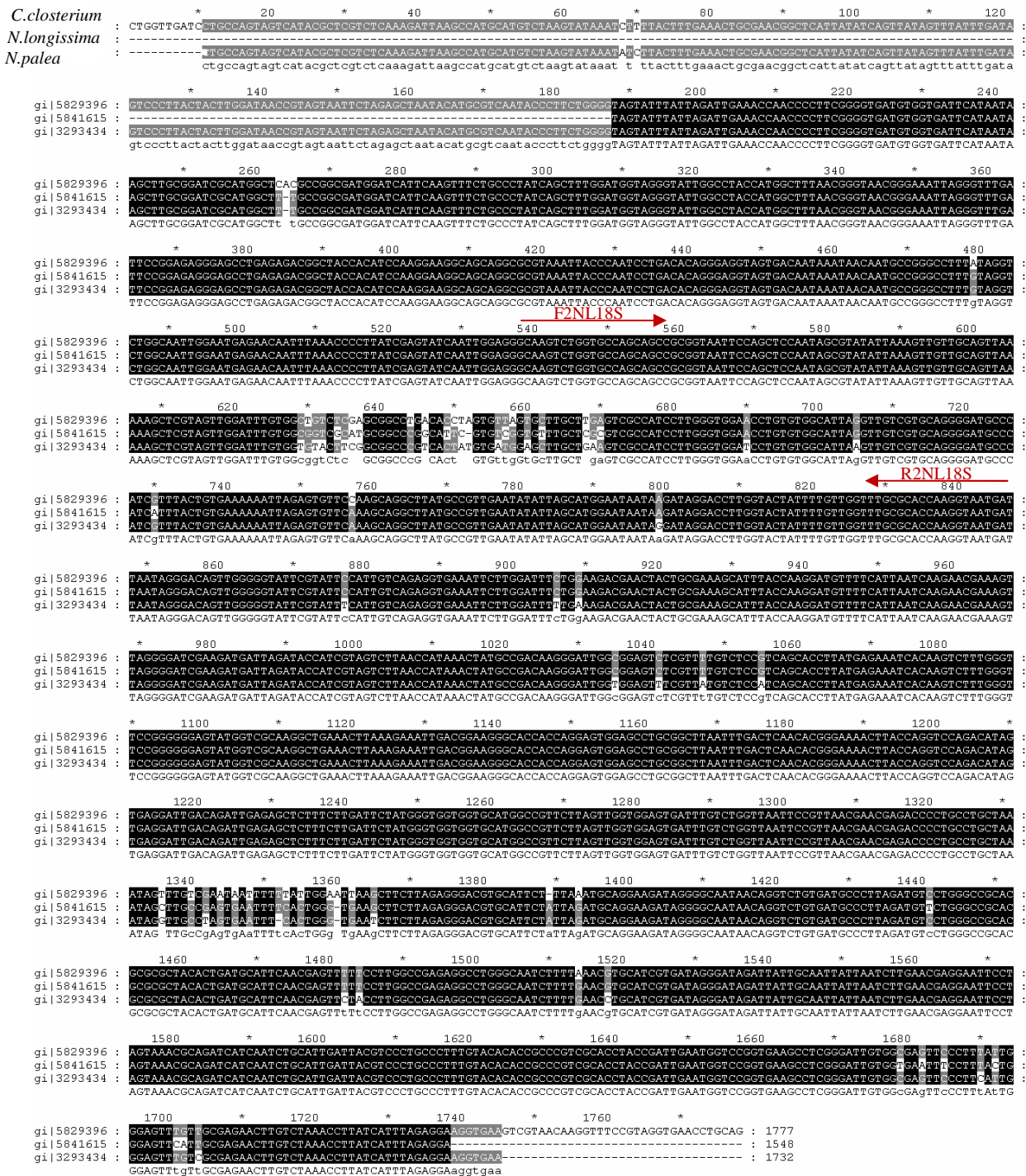


Figure 25. Schéma général de l'emplacement de quelques amorces utilisées en PCR afin d'identifier les différentes espèces. **F** = Forward (amorce sens), **R** = Reverse amorce (amorce anti-sens), **N** = Nested (amorce chevauchante).

Tableau 1. Nom, séquence et température d'hybridation des amorces utilisées pour identifier les différents microorganismes; **F** = Forward (amorces sens), **R** = Reverse (amorces anti-sens), **N** = Nested (amorce chevauchante) **S** = G / C; **R** = G / A; **M** = A / C; **W** = A / T; **K** = G / T; **Y** = T / C.

Gènes amplifiés	Nom des amorces	Séquence 5'→3', (nombre d'acides nucléiques)	Température d'hybridation °C
16S	Fph16S	GCAAGCGTTATCCGGAATKAT(21)	61
	Rph16S	CCTGTGTTTCGCGCTCCCGAA (20)	63
	NFph16S	TTATCCGGAATKATTGGGCGT (21)	61
	NRph16S	GTTCGCGCTCCCGAAGGCAC (20)	62
18S	F2NL18S	GCGCACCAAGGTAATGATTAA(21)	64
	R2NL18S	TTAATCATTACCTTGGTGCGC (21)	60
5,8S	FDSITS2	AGGCTAGCTCAAGGACCCGT (21)	64
	RDSITS2	AGGGCCGAGCCCATGGTCC (19)	66
5,8S	FNitITS2	TACAACCTTTCAGCGGTGGAT (20)	58
	RNitITS2	TACCAGAGATAGGACGAGGA(20)	56
5,8S	FcyldroITS2	TAACAAGGTTCCGTAGTGAA (20)	56
	RcyldroITS2	TAGCACAAAGGCTACTCTCA (20)	58
5,8S	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG(19)	52
	ITS2	TCCTCCGCTTATTGATATGC (20)	52
ribulose biphosphate carboxylase	rbcL1	AAGGAGAAATHAATGTCT (18)	52
	rbcL7	AARCAACCTTGTGTAAGTCTC(21)	52
18S	18sF	CCGGCGATGGATCATTCAAGT(21)	58
	18sR	TTCACCGGACCATTCAATCGG (21)	58



3.3. Recherche du gène SOS1

Afin de rechercher le gène SOS1 chez les deux micro-algues et la cyanobactérie, nous avons effectué une recherche informatique de séquences de ce gène dans les banques de données chez la macro-algue brune marine, *Ectocarpus siliculosus* et d'un gène codant un transporteur d'ion sodium appartenant à la famille des CAP (monovalent cation–proton antiporter) chez la Prasinophyte *Ostreococcus lucimarinus*. Des amorces ont été déterminées au niveau de zones conservées à partir d'un alignement de ces séquences (Fig. 28). Un deuxième alignement a été effectué à partir des séquences d'une monocotylédone marine de la famille des Cymodoceaceae, *Cymodocea nodosa* et d'*Ostreococcus lucimarinus* (Fig. 27 et 29). A notre connaissance, aucune caractérisation de ce gène n'a été effectuée chez les micro-algues. L'ADNg des micro-algues a été amplifié avec ces amorces par PCR. Les amorces utilisées ont été désignées sur les alignements de séquences mais aussi de façon chevauchantes (Nested) afin d'optimiser les chances de cibler le gène d'intérêt (Tableau 2). Les PCR sont effectuées en utilisant le mélange réactionnel suivant : 1X tampon *Taq*, 0,2 μ M dNTP, 2,5 mM $MgCl_2$, chacune des amorces à 0,2 μ M, 0,6 unités *Taq* polymérase et 100 ng D'ADNg. Les cycles PCR d'amplifications se sont déroulés après une première dénaturation de 3 min à 94 °C puis 35 cycles composés de 30 s à 94 °C; 1 min à la température d'hybridation requise, 1 min à 72 °C. La PCR se termine par un temps d'élongation terminale de 10 min à 72 °C.

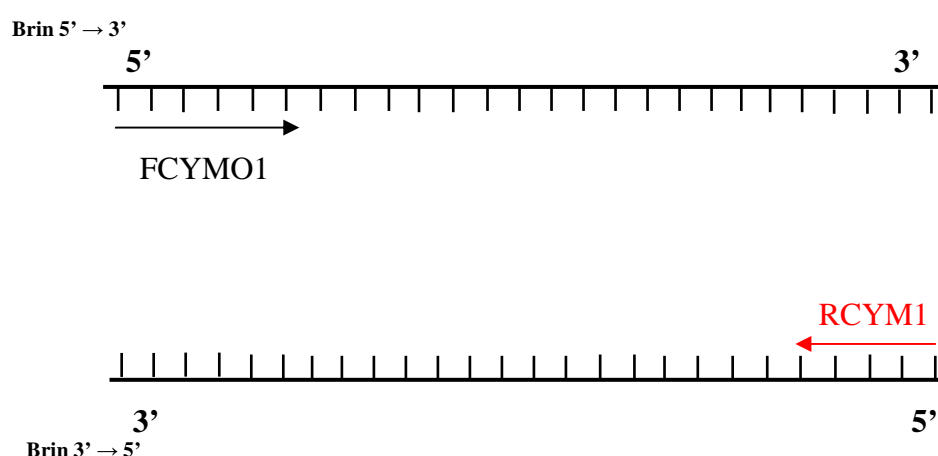


Figure 27. Schéma général de l'emplacement de quelques amorces utilisées en PCR afin de rechercher le gène SOS1. **F** = Forward (amorce sens), **R** = Reverse amorce (amorce anti-sens)

Tableau 2. Nom, séquence et température d'hybridation des amorces utilisées pour identifier le gène SOS1; **F** = Forward (amorces sens), **R** = Reverse (amorces anti-sens), **N** = Nested (amorce chevauchante) **S** = G / C; **R** = G / A; **M** = A / C; **W** = A / T; **K** = G / T; **Y** = T / C.

Nom des amorces	Séquence 5'→3', (nombre d'acides nucléiques)	Température d'hybridation °C
FCYMO1	ATCCYGTGTCYGTGTYGCC (20)	62,4°C
FCYMO2	AGGSGAGTCKCTYRTGAATGA (21)	58,8°C
RCYMO1	CSACAGCKCCMCKYARRCC (19)	63,1°C
OS1F1	GCKACMGATCCCGTCGC (17)	60°C
NOS1F1	CCCGTCGCSGTGTCGC (17)	63,6°C
OS1F2	CATCGTSGTSTTCRASGT(22)	58,4°C
OS1F3	GGYGTKCTYGSCRTCGTSG(19)	63,1°C
OS1R1	ACAGCRYCSCRATMMCKGCG (20)	63,5°C
OS1R2	CACGACRAGCGCSAG(15)	54,7°C
OS1R3	CGACRGCRCCWCGWAGACC(19)	63,1°C
OS1R4	CSACGAYGSCRAGMACRCC(19)	63,1°C
OS1R5	AAAMACSTYGAASACSACGATG(22)	58,4°C

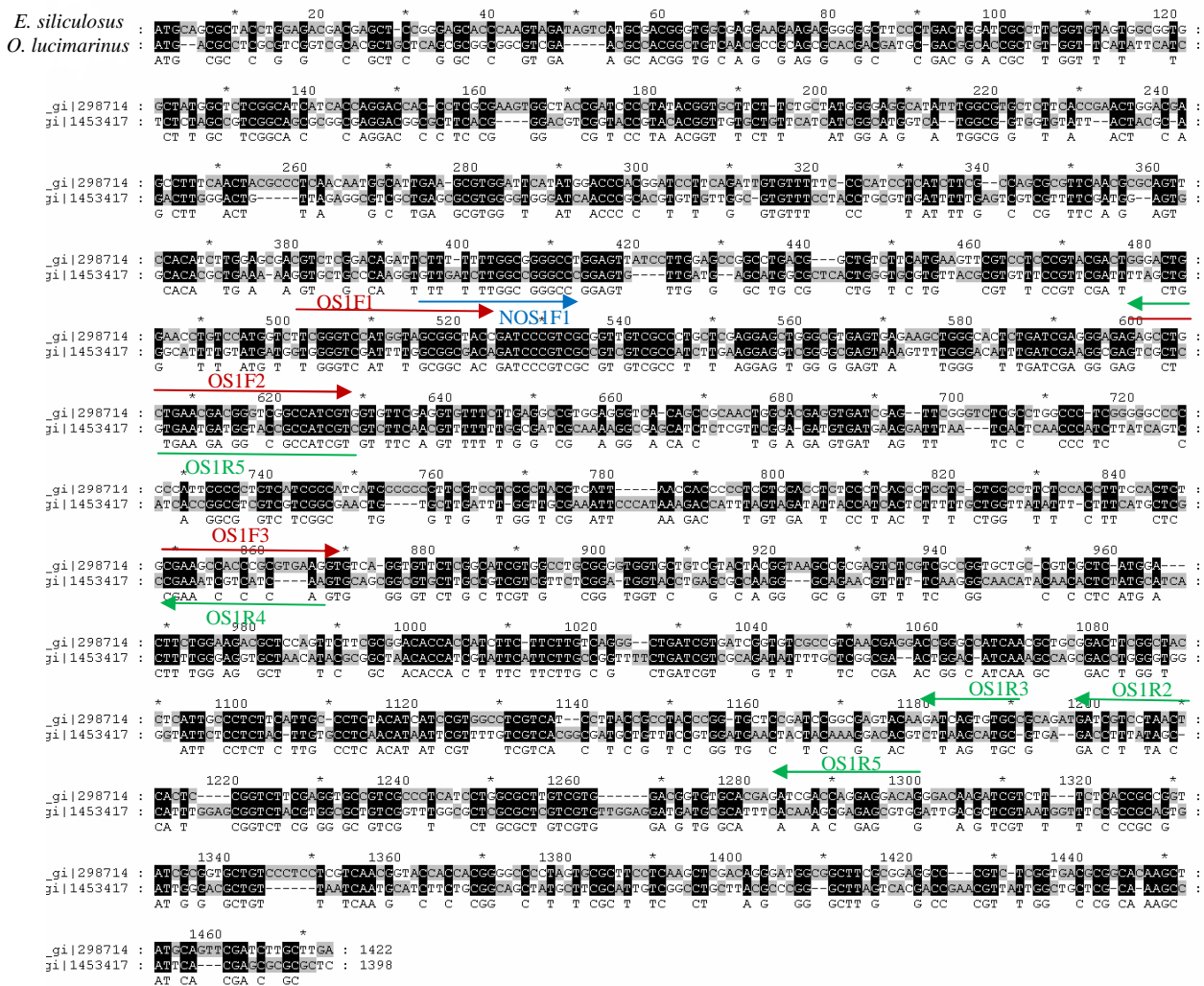


Figure 28. Alignement des séquences nucléotidiques du gène SOS1 chez *Ectocarpus siliculosus* et *Ostreococcus lucimarinus*

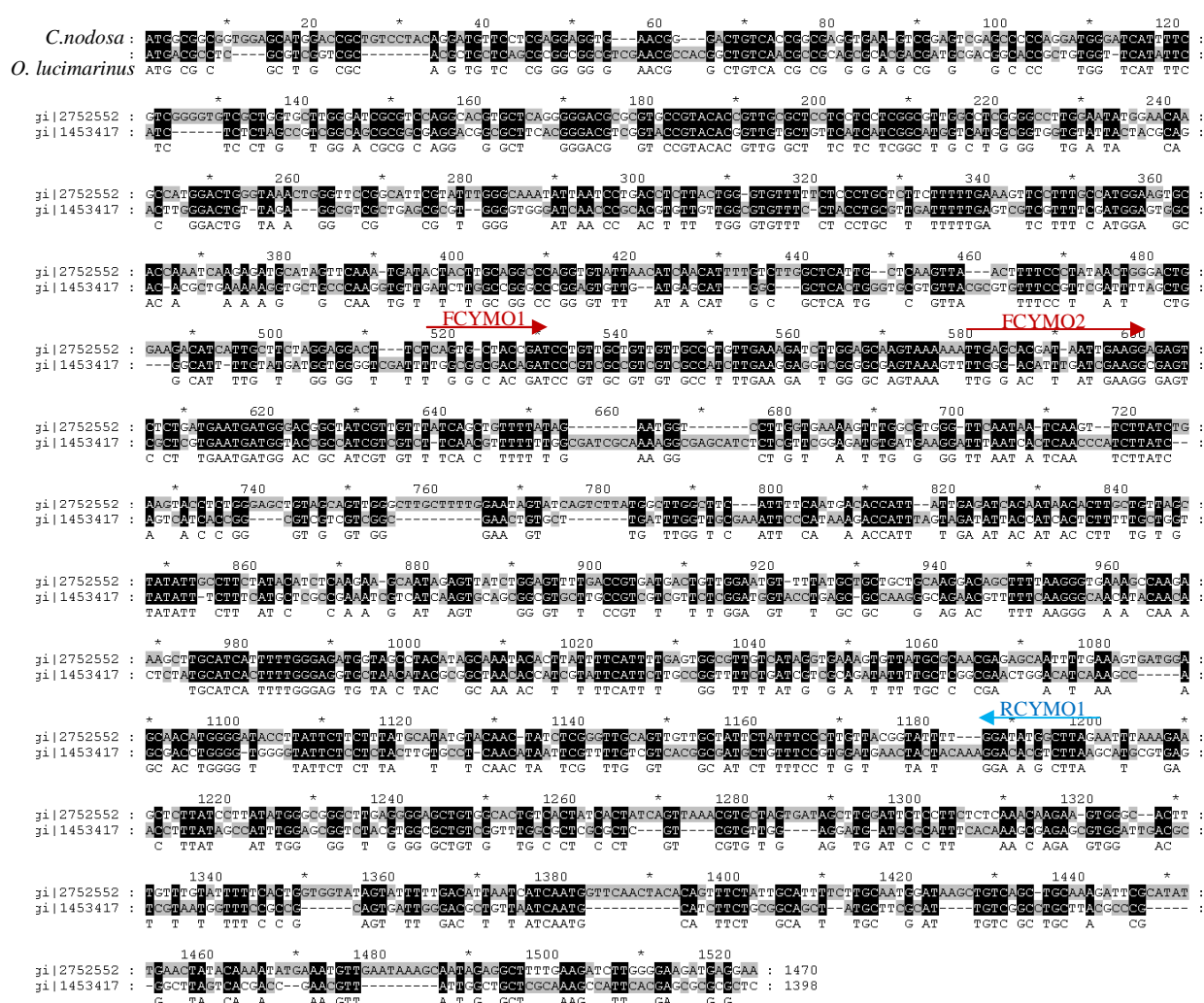


Figure 29. Alignement des séquences nucléotidiques du gène SOS1 chez *Cymodocea nodosa* et *Ostreococcus lucimarinus*

3.4. Electrophorèse et purification des fragments amplifiés

Les fragments d'intérêt amplifiés et visualisés sur gel d'agarose 1 % sont découpés et sont élués grâce au « Wizard SV Gel and PCR Clean up System kit » (Proméga) en suivant le protocole recommandé. Après dissolution de l'agarose (ajout d'une solution d'accrochage et incubation à 60 °C pendant 10 min), le mélange est filtré sur des colonnes qui retiennent l'ADN. Après deux lavages successifs en présence d'un tampon contenant de l'éthanol, l'ADN est récupéré par ajout de 30 µL d'eau ultra pure stérile après centrifugation à 16 000 g pendant 1 min. L'ADN est stocké à -20 °C pour être conservé ou utilisé lors du clonage.

3.5. Ligation, clonage et extraction de plasmide

Le fragment d'intérêt purifié est inséré dans un plasmide pGEM (Proméga) qui comprend un gène de résistance à l'ampicilline (Ampr), le gène de l'opéron lactose (Lac Z) dans lequel il y a un site d'insertion du fragment d'ADN. L'interruption du gène provoque l'absence de synthèse de l'enzyme dégradant le X-Gal et permet un crible blanc / bleu des bactéries. 3 μL de produit de purification PCR sont additionnés à 5 μL de tampon de ligation 2X (Tris-HCl 60 mM pH 7.8, MgCl_2 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM et polyéthylène glycol 10 %) à 1 μL de T4 DNA ligase (3U/ μl) et 1 μL , soit 50 ng, du vecteur de pGEM-T (Proméga). Le mélange est maintenu pendant une nuit à 4°C. Puis, le plasmide modifié est introduit dans les bactéries compétentes *Escherichia coli* DH5 α . Ces dernières, en se divisant, multiplient le plasmide et donc le gène d'intérêt. 3 μL de plasmides transformés sont mélangés aux bactéries, puis le tout est incubé 30 min à 4 °C pour fragiliser la paroi bactérienne. Un choc thermique à 42 °C pendant 42 s est effectué avant de laisser le mélange pendant 2 min sur de la glace. 900 μL de milieu LB liquide (Milieu Luria-Bertani : Bacto tryptone 10 g L^{-1} , extrait de levure 5 g L^{-1} , NaCl 5 g L^{-1}) sont ajoutés. Afin que la paroi bactérienne se reconstitue, le tout est placé pendant 1 h à 37 °C sous agitation (180 rpm).

Pour les bactéries en suspension dans le milieu LB, une centrifugation pendant 5 min, à 900 g, est réalisée afin de concentrer le culot bactérien dans environ 100 μL . 45 μL sont étalés sur des boîtes de Pétri contenant un milieu solide (agar) LB Amp (10 mg mL^{-1}), X-Gal (2 %), IPTG (200 mg mL^{-1}). Les boîtes de Pétri sont placées à 37 °C pendant 18 h, afin que les bactéries résistantes à l'ampicilline puissent se développer. Seules les colonies blanches (plasmide ayant intégré de l'ADN) seront repiquées en milieu LB Amp (entre 12 et 25 clones) (Fig. 30). L'extraction de plasmide est réalisée par un kit de lyse Promega (wizard plus SV minipreps DNA purification system).

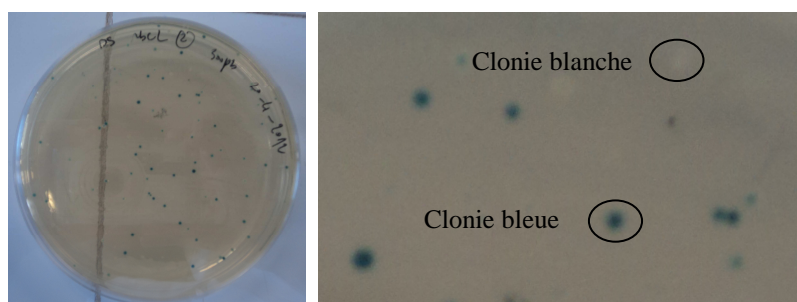


Figure 30. Produits de clonage mis en culture sur boîte de Pétri

3.6. PCR sur colonie et séquençage

Afin d'identifier les clones qui ont intégré le fragment à la taille recherchée, des amplifications PCR ont été effectuées avec les colonies repiquées sur des boîtes LB Amp comme matrice. Les PCR sont réalisées dans les mêmes conditions que précédemment mais en utilisant des amorces T7 / M13 présentes sur le plasmide et à 53 °C. Les clones positifs, après la PCR sur colonies, sont repiqués dans des tubes contenant 4 mL de milieu liquide LB Amp (10 mg mL⁻¹) et placés une nuit à 37 °C sous agitation à 180 rpm. Les plasmides issus des colonies positives ont été envoyés au séquençage (Beckman Coulter genomics, Angleterre).

4. Etude comparative en vue d'une culture à grande échelle de *Dunaliella salina* et d'autres microalgues d'intérêt commercial

4.1. La croissance

D. salina (Chlorophyceae, saline de Sfax), *Chlorella vulgaris*, (microalgue d'eau douce; Trebouxiophyceae), *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae) et *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae; souches commerciales provenant de l'institut Tinamenor S.A. Marisma de Pesués, Cantabrie, Espagne) ont été cultivées dans le milieu Walne modifié (1991, annexe 2), sous un éclairage de 27 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E27) et deux régimes photopériodiques : lumière continue (24L : 0D) ou alternance jour/ nuit avec une photopériode de 12 h (12L : 12D), et à une température de 22 \pm 1°C. La concentration en sels du milieu de culture est de 25 p.s.u sauf pour *D. salina* (100 p.s.u). Les courbes de croissance de chaque espèce ont été obtenues pendant 11 jours par dénombrement cellulaire (hémocytomètre). La densité initiale de chaque culture est égale à 5 10⁵ cellules mL⁻¹.

4.2. Les composées biochimiques

Les cellules ont été récoltées par centrifugation (2 000 g, 10 min) afin d'extraire les métabolites au cours des trois phases de croissance : latence, exponentielle et stationnaire. Les teneurs en pigments photosynthétiques (Chl *a* et caroténoïdes) ont été calculées selon les équations de SCOR-Unesco (1966). Les protéines totales ont été déterminées par la méthode de Lowry et al. (1951). Les glucides solubles ont été déterminés selon la méthode de Dubois et al. (1956) et les lipides totaux selon la méthode de Folch et al. (1957).

4.3. Les acides gras

Pour les analyses des acides gras, les cultures ont été récoltées à la fin de la phase exponentielle. Le dosage a été réalisé en 4 étapes : extraction des lipides, préparation des esters méthyliques d'acides gras (EMAG, Lepage et Roy, 1984) puis passage des échantillons dans le chromatographe en phase gazeuse (CPG).

L'échantillon est broyé dans 10 ml de méthanol servant à précipiter les protéines; afin de solubiliser les lipides associés aux protéines on rajoute 20 ml de chloroforme. L'ensemble est alors homogénéisé pendant 3 à 4 mn. Le passage au bain marie durant 30 mn à 56 °C favorise l'extraction des lipides qui sont solubles à chaud. Après filtration et lavage avec de l'eau physiologique (0,9 % de NaCl) pour saturer la phase organique et permettre ainsi le relargage des lipides, on centrifuge 15 mn à 2000 tr/mn. On obtient alors deux phases, la phase inférieure contient les composés lipidiques. Cette phase sera ensuite filtrée sur du Na_2SO_4 qui chasse l'eau existant dans la phase chloroformique. L'évaporation à froid des solvants se fait sous flux d'azote afin d'éviter l'oxydation des acides gras. L'extrait lipidique total est alors repris dans de l'hexane.

La CPG permet uniquement l'analyse de composés volatils, ce qui n'est pas le cas des acides gras. Ceux-ci, de part leur nature peu volatile, sont très difficiles à analyser directement par CPG, à moins d'augmenter la température, ce qui endommagerait la phase stationnaire des colonnes. Il faut donc transformer ces acides gras en esters méthyliques correspondants plus volatils. On reprend l'extrait lipidique dans 1 ml d'hexane et de la soude (200 µl), qui après chauffage conduit à une transformation en sels sodiques d'acides gras (savons) par saponification alcaline. L'ajout d'acide sulfurique méthanolique (200 µl) et le chauffage à 90 °C permettent l'estérification des acides gras qui ne peut se réaliser qu'en milieu acide et à haute température. Ensuite une séparation des acides gras (EMAG) des autres constituants (hydrocarbures, pigments) est réalisée par centrifugation. Afin d'éviter l'oxydation des acides gras, les solvants sont évaporés à froid sous flux d'azote. Les EMAG sont enfin repris dans de l'hexane (un solvant de faible point d'ébullition) qui les solubilise, quantifiés et analysés par CPG. Le principe de fonctionnement de la CPG est le suivant : l'échantillon est vaporisé et injecté dans une colonne de 25 m (CP cire 58, Varian SA, Les Ulis, France ; 0,32 mm de diamètre et 0,52 mm d'épaisseur), il est ensuite pris en charge par l'azote qui joue ici le rôle de gaz vecteur. Au cours de l'élution, le long de la colonne, les esters d'acides gras sont retenus plus au moins longtemps en fonction de leur affinité relative

entre la phase gazeuse et la phase liquide. L'affinité dépend de la longueur et du degré d'insaturation des acides gras. Les différents composés séparés sur la colonne sont détectés à la sortie par un détecteur à ionisation de flamme (FID). Lorsque le soluté, issu de la colonne, arrive au niveau du détecteur, l'éluat de la colonne est mélangé avec de l'hydrogène et de l'air, ce mélange est enflammé électriquement. De nombreux composés organiques sont pyrolysés (décomposition ou thermolyse d'un composé organique par la chaleur pour obtenir d'autres produits qu'il ne contenait pas) à la température de la flamme produisant ainsi des ions et des électrons capables de conduire l'électricité à travers la flamme. Ce potentiel électrique est alors mesuré par le détecteur, qui après traitement des données par un logiciel informatique, fournit les chromatogrammes. Une programmation de température du four permet d'obtenir tous les pics (Température initiale 180 °C, température finale 250 °C, une première augmentation de 180 à 220 °C de 10 °C min⁻¹ pendant 5 min, une deuxième augmentation de 220 à 240 °C de 2 °C min⁻¹ pendant 10 min et une dernière augmentation 240 à 250 °C de 5 °C pendant 15 min). Pour reconnaître les acides gras contenus dans nos échantillons, nous commençons tout d'abord par injecter des produits étalons composés d'un ensemble de lipides connus. Connaissant à présent les temps de rétention des standards (Supelco), nous pouvons les comparer avec les temps de rétention obtenus après injection de nos échantillons pour identifier les AG.

4.4. Calcul de l'énergie et de la productivité des micro-algues

Le contenu énergétique des microalgues est déterminé en multipliant les concentrations en protéines, glucides et lipides et par 4, 3,75 et 9 respectivement, et en additionnant les résultats (Fuentes et al., 2000).

La production (mg L⁻¹) de protéines (P), glucides (S) et lipides (L) est calculée en multipliant la densité cellulaire en phase exponentielle de croissance avec les teneurs des cellules en P, S et L (mg cellule⁻¹).

5. Analyses statistiques

5.1. Analyse STATICO

Les analyses multi-variées sont les outils couramment utilisés pour faire ressortir les liens entre les paramètres environnementaux et biologiques et pour comprendre la structure des communautés écologiques (Marques et al., 2011). Ces analyses englobent: l'analyse factorielle des correspondances (AFC, Sylvestre et al., 2001), l'analyse de partitionnement de données ou cluster (Dolapsakis et al., 2005), l'analyse canonique des correspondances (ACC,

Lopez-Flores et al., 2006) et l'analyse en composantes principales (ACP, Anneville et al., 2004, Grover et al., 2006). Ces analyses sont souvent utilisées dans les études écologiques (Thioulouse, 2011). La saline de Sfax a déjà fait l'objet de plusieurs études écologiques basées sur l'ACP (Ayadi et al., 2002; 2004; Elloumi et al., 2009 ; Abid et al., 2008 ; Khemakhem et al., 2010 ; Kobbi-Rebai et al., 2013). Cependant, les processus physiques et biologiques sont souvent corrélés entre eux, et en général montrent des schémas complexes de variation, des analyses plus structurées pourraient donc être utiles. Les outils qui tiennent compte de la variation temporelle des paramètres environnementaux et des assemblages biologiques et l'effet de la première sur le second sont rares (Carassou et Ponton, 2007). La méthode STATICO (bibliothèque ade4, R) (Thioulouse et al., 2004) est particulièrement adaptée pour étudier la relation stable entre l'abondance des espèces et les paramètres environnementaux lorsque les deux varient au fil du temps. Cette technique a été déjà utilisée par Mendes et al. (2009) pour étudier la structure spatio-temporelle des diatomées dans l'estuaire tempéré Ria de Aveiro (Portugal) suivant un gradient de salinité allant de l'eau douce à la mer. Nous avons utilisé cet outil afin de caractériser la structure de la communauté phytoplanctonique dans la saline de Sfax en fonction des variables environnementales partir de Juin 2010 à mai 2011 et d'analyser sa dynamique. Pour cela, nos données ont été traitées dans les paires de tables écologiques : une table pour les variables de l'environnement et un autre pour les abondances pour chaque date d'échantillonnage. Les 18 variables environnementales et l'abondance de 64 espèces ont été spécifiées dans les colonnes dans leurs tables respectives. Les sites d'échantillonnage ont été précisés dans les lignes et sont les mêmes pour toutes les tables. Une transformation en $\log(x + 1)$ a été appliquée à l'abondance des espèces avant calculs (Legendre et Legendre, 1979) afin de minimiser l'effet dominant de prises exceptionnelles. STATICO effectue une analyse triadique partielle sur une série de tableaux croisés résultant de l'analyse de co-inertie de chaque paire de tables (Thioulouse et Chessel, 1987). L'analyse se fait en trois étapes : (1) l'analyse de chaque table (PCA normé pour les variables environnementales et centrée PCA pour les données sur les espèces), (2) l'analyse de chaque paire de tables par une analyse de co-inertie (Doledec et Chessel, 1994) qui fournit une image de la co-structure (position moyenne espèces /variables) à chaque date d'échantillonnage, (3) la réalisation d'une analyse triadique partielle (Thioulouse et Chessel, 1987) sur les tables résultant pour obtenir une image moyenne de la co-structure. La troisième étape révèle la partie de la structure entre l'environnement et les tables d'abondance d'espèces qui est stable sur la période d'échantillonnage (compromis). STATICO permet également de tracer la projection des sites de prélèvement pour chaque date d'échantillonnage sur les axes

de compromis, en termes de variables environnementales et des structures de l'abondance des espèces. Par conséquent, il permet de discuter de la variation temporelle de la structure espèces-environnement (trajectoires).

5.2. Analyse de variance (ANOVA)

L'ANOVA (Analysis of Variance) est une méthode très utilisée pour analyser les résultats d'expériences contrôlées, réalisées au laboratoire. Selon la nature des facteurs, les intentions sont généralement différentes. Dans notre étude, nous avons recours à l'analyse de variance de deux facteurs avec répétition d'expérience (ANOVA) afin de vérifier d'une part, l'impact du NaCl et des niveaux d'éclairement aux paramètres physiologiques mesurés. D'autre part l'analyse de variance d'un facteur avec répétition d'expérience est utilisée pour confirmer l'impact du NaCl sur l'activité des enzymes antioxydants.

5.3. Test de Student

Le test de Student a été réalisé pour évaluer les différences entre les valeurs moyennes de la croissance et les paramètres biochimiques chez *D. salina*, *Chlorella vulgaris*, *Isochrysis galbana* et *Nannochloropsis* sp. Les différences étaient considérées comme significatives à $p < 0,05$.

5.4. Test de Kruskal Wallis

Ce test a été utilisé afin d'identifier s'il existe des différences significatives entre les bassins et les échantillons pour les différentes variables physico-chimiques sur le terrain. C'est un test non paramétrique (sans conditions particulières comme la distribution normale des données, égalité des variances entre les bassins). Il est basé sur le classement des valeurs (rangs) : si toutes les valeurs élevées d'une variable correspondent à un même bassin et toutes les valeurs faibles à un autre bassin, le test indique une différence significative alors que si les valeurs de tous niveaux sont également réparties dans tous les bassins, il n'indique pas de différence significative.

Troisième Partie :

Résultats et Discussion



Troisième Partie : Résultats et Discussion

Chapitre I : La saline de Sfax

1. Les paramètres écologiques

La caractérisation physico-chimique de tout éco-système permet de mieux comprendre son mode de fonctionnement avec toutes les entités biologiques qui dominent. Dans la saline de Sfax, composée d'une mosaïque de micro-écosystèmes, nous avons suivi l'évolution des paramètres bio-physicochimiques dans les eaux de 7 bassins de salinité croissante : A5, A16, C21, C41, M2, B1 et TS. L'étude a été réalisée sur un cycle annuel : du mois de Juin 2010 au mois de Mai 2011. Les paramètres mesurés sont la température, le pH, la densité, la matière en suspension, la salinité, l'oxygène dissous et les éléments nutritifs. Ces paramètres sont présentés dans le tableau 3 avec les tests ANOVA. Le gradient de salinité est très net, depuis la prise d'eau jusqu'aux tables salantes. L'augmentation de la salinité est bien observée du bassin A5 au bassin TS, variant de $42 \pm 2,5$ dans A5 à $346,30 \pm 41,4$ en TS. La densité de l'eau suit l'augmentation de la salinité (test de Pearson, $r = 0,70$, $p < 2,210 \times 10^{-16}$). En effet, la densité la plus élevée a été enregistrée en TS ($1,17 \pm 0,07$). Bien au contraire, l'oxygène dissous a diminué avec la salinité ($r = -0,93$, $p = 5 \times 10^{-6}$), variant de $6,55 \pm 0,07$ mg L⁻¹ dans le bassin le moins salé (A5) à $2,03 \pm 0,07$ mg L⁻¹ dans le bassin le plus salé (TS).

Les concentrations de la matière en suspension (SM) varient entre $467,63 \pm 610,26$ mg L⁻¹ (A5) et $9205,86 \pm 8274,65$ mg L⁻¹ (TS), et suivent l'augmentation de la salinité ($r = 0,65$, $p < 2,2 \times 10^{-16}$). La température moyenne de l'eau n'a pas montré de variations significatives entre les bassins, fluctuant entre $25 \pm 6,45$ °C et $27 \pm 6,63$ °C. La plus faible température (15 °C) a été enregistrée en Mars 2011 à C21 et la température la plus élevée (39 °C) a été enregistrée en Août 2010, en M2. Globalement, le pH diminue avec la salinité ($r = -0,43$, $p = 1,2310^{-7}$), variant de $8,23 \pm 0,45$ dans A16 à $7,36 \pm 0,42$ en TS. Concernant les nutriments, les ions nitrates (NO₃⁻), l'ammonium (NH₄⁺) et l'azote total (NT) ne montrent aucune variation significative entre les bassins. Les ions nitrites (NO₂⁻) augmentent avec la salinité ($r = 0,36$, $p = 1,36 \times 10^{-5}$), variant de $0,54 \pm 0,5$ µmol L⁻¹ dans le bassin à tendance marine (A5) à $1,24 \pm 1,27$ µmol L⁻¹ dans le bassin de saturation (TS). Les ions ortho-phosphates (PO₄³⁻) et le phosphore total varient considérablement entre les bassins, mais indépendamment de la salinité. Les silicates ne montrent pas de variations significatives entre les bassins. Les concentrations en pigments photosynthétiques varient considérablement entre les bassins. Les concentrations en Chl *a*, Chl *b* et Chl *c* ont diminué avec l'augmentation de la

salinité ($r = -0,48$; $-0,21$; $-0,21$; $p = 1,93 \cdot 10^{-9}$; $0,012$; $0,012$ respectivement), tandis que les caroténoïdes augmentent lorsque la salinité augmente ($r = 0,54$, $p = 6,63 \cdot 10^{-12}$).

Tableau 3 a. Les paramètres physico- chimiques au cours de la période étudiée dans les sept bassins d'échantillonnage de la saline de Sfax (Juin2010 à Mai 2011), Abréviations : S : salinité; D, densité : MES, matière en suspension; T : température; D-O₂ : oxygène dissous; Moy : moyenne; Ecar : écart-type; Min : minimum; Max : maximum. * : la différence entre les bassins est significative

Bassin		A5	A16	C21	C41	M2	B1	TS	Kruskal Wallis df =6
S	Moy	42,10	61,45	88,65	95,53	191,35	224,25	346,30	
	Ecar	2,47	8,75	5,47	9,31	11,36	10,64	41,45	K = 134,20*
	Min	38	44	74	76	164	210	284	P = $1,68 \cdot 10^{-26}$
	Max	46	78	97	106	210	250	420	
D	Moy	0,98	0,99	0,99	1	1,1	1,1	1,17	
	Ecar	0,04	0,06	0,09	0,1	0,1	0,1	0,07	K= 75,97*
	Min	1	0,85	0,83	0,8	0,9	0,9	0,97	P = 10^{-4}
	Max	1	1,09	1,17	1,2	1,2	1,3	1,26	
MES (mg L ⁻¹)	Moy	467,63	548,66	691,64	740,76	2378	2963,99	9205,86	
	Ecar	610,26	544,26	867,77	1079,88	2229,3	1915,72	8274,65	K= 90,42*
	Min	58	60	130	108,57	600	604,54	2940	P = 10^{-4}
	Max	2375	1842,42	3660	3846,15	9500	9266,66	39533,33	
D-O ₂ (mg L ⁻¹)	Moy	6,55	6,05	5,26	5,15	3,36	2,99	2,03	
	Ecar	0,67	0,74	0,46	0,61	0,30	0,20	0,25	K= 122,07*
	Min	5,48	5,16	4,71	4,35	2,95	2,60	1,66	P = $5,9610^{-24}$
	Max	7,59	7,46	6,17	6,32	3,80	3,31	2,49	
T (°C)	Moy	26,20	25,38	25,63	25,35	26,8	25,33	27,25	

	Ecar	6,46	6,36	5,82	6,44	6,65	6,45	6,63	K= 1,80
	Min	17	16,50	15	16	18	16	18	P = 9,37 10 ⁻¹
	Max	38	36	34	36	39	36	38	
	Moy	8,13	8,23	8,13	8,09	8,06	7,86	7,36	
pH	Ecar	0,50	0,45	0,36	0,40	0,54	0,78	0,42	K = 35,08*
	Min	7,02	7,05	7,05	6,88	6,34	5,53	6,23	P = 10 ⁻⁴
	Max	8,92	8,9	8,57	8,53	8,53	8,49	7,95	

Tableau 3 b. Les éléments nutritifs ($\mu\text{mol L}^{-1}$) au cours de la période étudiée dans les sept bassins d'échantillonnage de la saline de Sfax (Juin2010 à Mai 2011), Abréviations : NO_2^- : nitrites; NO_3^- : nitrates; NH_4^+ : ammonium; PO_4^{3-} : ortho-phosphates; T-P : phosphore total; T-N : azote total; SiO_3^{2-} : silicates; Moy : moyenne; Ecar : écart-type; Min : minimum; Max : maximum. * : la différence entre les bassins est significative

Bassins		A5	A16	C21	C41	M2	B1	TS	Kruskal Wallis df =6
NO_2^-	Moy	0,54	0,40	0,55	0,52	0,69	0,90	1,24	
	Ecar	0,50	0,36	0,68	0,42	0,57	0,48	1,27	K = 23,34*
	Min	0,13	0,13	0,16	0,19	0,18	0,12	0,19	P = 10^{-3}
	Max	2,37	1,45	3,05	1,94	2,23	1,90	4,91	
NO_3^-	Moy	4,12	4,36	4,56	5,77	4,98	6,37	7,18	
	Ecar	2,70	3,62	3,86	7,16	4,08	2,88	5,82	K = 13,67*
	Min	1,09	1,41	1,21	1,23	1,57	2,01	1,89	P = $3,3510^{-2}$
	Max	10,42	15,14	14,04	33,78	15,01	15,98	23,36	
NH_4^+	Moy	2,19	2	1,96	2,90	2,42	2,49	2,39	
	Ecar	1,15	1,1	0,99	1,94	1,85	1,62	1,29	K= 4,01
	Min	0,21	0,2	0,31	0,51	0,47	0,63	0,55	P = $6,75 \cdot 10^{-1}$
	Max	5,17	4	3,64	9,22	8,12	5,93	5,26	
PO_4^{3-}	Moy	3,24	1,01	0,85	2,18	2,88	3,94	2,64	
	Ecar	4,54	1,21	0,97	2,50	3,68	4,51	2,49	K = 14,66
	Min	0,26	0,14	0,16	0,15	0,12	0,19	0,20	P = $2,310^{-2}$
	Max	16	4,52	3,67	8,04	12,26	17	8,31	
(N/P) ratio	Moy	11,55	12,96	13,88	13,94	10,47	14,14	9,74	
	Ecar	10,83	8,63	8,89	15,27	13,93	19,76	10,94	K = 7 ,01
	Min	0,48	2,29	2,01	0,55	0,40	0,89	0,76	P = 3210^{-2}
	Max	34,95	33,03	39,49	61,93	61,86	77,54	39,72	

T-N	Moy	21,85	22,06	22,80	23,74	21,75	21,46	25,09	
	Ecar	3,25	4,81	5,38	7,58	5,15	3,63	10,64	K= 7,20
	Min	16,84	17,17	16,23	18,54	18,79	18,20	18,89	P = 3,0210 ⁻¹
	Max	30,87	40,99	41,25	53,47	39,84	33,78	66,52	
T-P	Moy	9,32	5,72	5,27	8,18	10,87	12,72	10,52	
	Ecar	9,20	1,65	3,28	7,45	10,8	11,24	7,08	K= 11,67
	Min	2,54	16,81	1,95	1,67	1,87	1,87	1,55	P = 6,9710 ⁻²
	Max	37,87	40,99	14,67	26,98	39,51	40,75	26,87	
SiO ₃ ²⁻	Moy	34,74	22,10	26,59	26,87	39,93	37,68	50,55	
	Ecar	38,74	13,14	46,86	46,07	44,13	52,84	47,75	K = 24,29
	Min	4,20	5,80	3,77	5,22	8,70	5,53	12	P = 4,6110 ⁻⁴
	Max	187,19	61,04	222,46	219,06	187,71	253,21	218,54	

Tableau 3 c. Les concentrations en pigments ($\mu\text{g L}^{-1}$) et l'indice de diversité spécifique H'
 Chl *a* : chlorophylle *a*; Chl *b* : chlorophylle *b*; Chl *c* : chlorophylle *c*; Car : caroténoïdes; H' :
 indice de diversité de Shannon–Weaver's; Moy : moyenne; Ecar : écart-type; Min : minimum;
 Max : maximum. * : la différence entre les bassins est significative

Bassins	Kruskal Wallis							
	A5	A16	C21	C41	M2	B1	TS	df =6
Chl <i>a</i>	Moy	1,09	0,70	0,92	0,77	0,40	0,28	0,12
	Ecar	0,98	0,49	0,68	0,50	0,55	0,25	0,13
	Min	0,04	0,11	0,04	0,16	0	0	0
	Max	3,79	1,90	2,64	2,44	2,45	0,94	0,40
Chl <i>b</i>	Moy	0,32	0,27	0,03	0,04	0,09	0,03	0,07
	Ecar	0,41	0,47	0,08	0,14	0,19	0,08	0,12
	Min	0	0	0	0	0	0	0
	Max	1,60	1,73	0,35	0,63	0,71	0,35	0,36
Chl (<i>c</i> 1 + <i>c</i> 2)	Moy	0,62	0,32	0,05	0,16	0,30	0,07	0,11
	Ecar	0,71	0,43	0,15	0,40	0,44	0,20	0,16
	Min	0,01	0	0	0	0	0	0
	Max	2,94	1,93	0,58	1,77	1,54	0,76	0,51
Car	Moy	0,05	0,05	0,05	0,05	0,09	0,07	1,63
	Ecar	0,05	0,05	0,05	0,03	0,17	0,06	1,44
	Min	0	0	0,00	0	0	0	0,02
	Max	0,19	0,20	0,17	0,10	0,55	0,17	4,44
H' (bits cell ⁻¹)	Moy	2,11	1,79	2,04	1,29	1,43	0,70	0,38
	Ecar	0,87	0,83	0,88	0,97	0,51	0,50	0,47
	Min	0,01	0,29	0,24	0	0,39	0,01	0
	Max	3,14	3,17	3,48	3,44	2,16	1,54	1,68

2. Les communautés phytoplanctoniques

Pour appréhender l'étude du peuplement phytoplanctonique, il est nécessaire de réaliser un examen qualitatif des différentes populations. Nous illustrons ci-dessus les résultats de la composition phytoplanctonique dans les sept bassins étudiés dans la saline de Sfax. Cet inventaire comprend 64 taxons phytoplanctoniques appartenant à 45 genres et cinq classes: Bacillariophyceae, Dinophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae et Euglenophyceae (Fig. 31).

La diversité des taxons du phytoplancton a été clairement liée à la salinité (Tableau 3a). En effet les valeurs de l'indice H' sont significativement différentes entre les bassins et diminuent du bassin A5 ($H' = 2,11$ bits de cellules⁻¹) au bassin TS ($H' = 0,38$ bits de cellules⁻¹), ce qui indique que les communautés phytoplanctoniques sont beaucoup plus diversifiées dans les bassins les moins salés que dans les tables salantes. Cette différence est également marquée qualitativement et quantitativement au niveau de la composition du phytoplancton des différents bassins (Fig. 31) et par la contribution de l'abondance relative de chaque espèce par rapport au phytoplancton total (Tableau 4). En effet, les Bacillariophyceae et Dinophyceae sont les deux groupes les plus diversifiés. Les Bacillariophyceae ou diatomées représentent 91,7 %, 77,5 % et 61 % du phytoplancton total dans les bassins A5, C21 et C41 respectivement (Fig. 31). Les trois espèces de diatomées pennées les plus abondantes sont *Cylindrotheca closterium*, *Nitzschia* sp., et *Navicula* spp (Tableau 4). Les Diatomées pennées dominent la densité de phytoplancton dans le bassin A5 (91,68%) et dans le bassin C41 (77,44%), dans laquelle la salinité varie entre 42 et 96 (Fig. 31). Les diatomées centriques sont moins diversifiées que les diatomées pennées. Leur contribution ne dépasse pas 0,16 %. Elles sont observées uniquement dans les bassins faiblement et moyennement salés. Les Dinophyceae étaient dominantes dans les bassins A16 et C21 avec des valeurs de salinité de l'ordre de 61 et 88 respectivement, contribuant de 37,12 % et 30,84 % à l'abondance totale du phytoplancton. Cette classe est presque absente dans les bassins salés (0,39 % et 0,01 % dans les bassins M2 et B1 respectivement).

Les espèces les plus abondantes, tout au long de la période d'échantillonnage appartenant à cette classe, étaient *Gymnodinium* spp. et *Peridinium* spp. Les Chlorophyceae sont présentes dans tous les bassins. Leur contribution ne dépasse pas 13,1 % à partir du bassin A5 au bassin C41, alors que cette classe domine les communautés phytoplanctoniques dans les bassins M2, B1 et TS représentant 73,83 %, 68,39 % et 92,85 % du phytoplancton total. Les Cyanophyceae sont représentées par quatre espèces : *Aphanothece* sp., *Oscillatoria*

spp., *Phormidium versicolor* et *Spirulina subsalsa*. Elles sont rares dans les bassins A5 (0,01 %), A16 (0,04 %), C21 (3,59 %) et C41 (0,25 %) et relativement abondantes dans les bassins M2 (13,66 %), B1 (31,31 %), et TS (7,02 %). *S. subsalsa* est la Cyanophyceae la moins tolérante au sel dans nos échantillons. Elle est signalée dans les bassins A5, A16, C41 et M2, elle prolifère dans le bassin C21 mais ne prolifère pas dans les bassins de salinité élevée (B1, TS). Les Euglenophyceae sont faiblement représentées par *Euglena* sp. dans le bassin A5 et se trouvent rarement dans les autres bassins plus salés. Pour chaque classe de micro-algues, nous pouvons clairement voir une diminution marquée en nombre de taxons avec l'augmentation de la salinité (Fig. 31, Tableau 4).

En résumé, la composition des espèces est significativement différente d'un bassin à l'autre. La présence d'une espèce dans un bassin et son absence dans un autre dépend surtout de sa capacité à tolérer le sel. Le calcul de l'optimum proposé par Resende et al. (2005) permet d'estimer la valeur moyenne de la salinité à laquelle chaque espèce peut se développer. La tolérance est un paramètre complémentaire indiquant l'amplitude de la gamme des salinités dans laquelle les espèces sont présentes (Tableau 4). Les espèces peuvent être classées en trois catégories en fonction de leur salinité optimale et de leur tolérance. De plus, la salinité optimale et la tolérance au sel sont significativement corrélées (test de Pearson, $r = 0,75$, $p = 1,35 \cdot 10^{-12}$). Dans notre étude, nous nous sommes basés sur la salinité optimale pour délimiter les catégories :

- La première catégorie comprend les espèces qui ont un intervalle de salinité en dessous de 100. Cette catégorie regroupe les Dinophyceae *Scrippsiella trochoidea*, *Protoperidinium* sp., *Gyrodinium* sp., *Prorocentrum gracile*, *Gymnodinium* spp., *Oxyrrhis marina*, *Peridinium* spp. Elle comprend également de nombreuses Bacillariophyceae comme *Grammatophora* sp., *Achnanthes* sp., *Amphipleura* sp., *Amphiprora* sp., *Amphora* sp., *Pleurosigma* sp., *Synedra* sp., *Pinnularia* sp., *Gyrosigma* sp., *Surirella* sp., *Navicula elegans* and *Gyrosigma* sp. Ces taxons ont été signalés principalement du bassin A5 au bassin C41 ayant une salinité moyenne comprise entre 42 et 95.
- La deuxième catégorie comprend les espèces qui ont un intervalle de salinité compris entre 100 et 200. Cette catégorie contient principalement les diatomées comme *Nitzschia* sp., *C. closterium*; *Epithemia* sp. et *Navicula* sp. Certaines Cyanophyceae se trouvent également dans cette catégorie, comme *S. subsalsa* qui est souvent signalée dans le bassin C21 ayant une salinité égale à 88.

- Les espèces ayant un intervalle de salinité au-delà de 200, constituent la dernière catégorie.

Les espèces les plus tolérantes sont essentiellement les Chlorophycées comme *D. salina* et *C. rubrifilum* et les Cyanophyceae telles que *Aphanothece* sp., *Oscillatoria* spp. et *P. versicolor* qui peuvent tolérer les concentrations de saturation en sel.

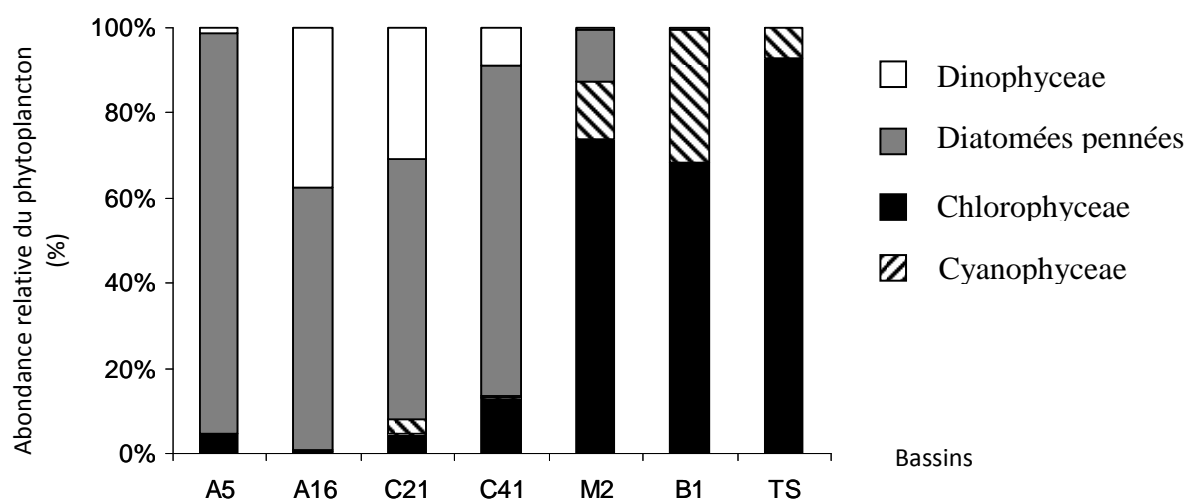


Figure 31. Abondance relative des différents groupes phytoplanctoniques par apport au phytoplancton total dans les sept bassins de salinité croissante, Euglenophyceae et diatomées centriques ne sont pas présentés, Ils représentent moins de 0,2%

Tableau 4. Contribution relative (%) de chaque taxon au phytoplancton total dans chaque bassin. La salinité optimale et la tolérance de salinité ont été calculées pour chaque espèce

Fréquence de chaque espèce par apport au total du phytoplancton % Classes		A5	A16	C21	C41	M2	B1	TS	Abréviation	Optimum de salinité (\hat{u}_k)	tolérance de salinité (t_k)
Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas</i>	0,046	0,176	0,087	0,365	8,086	1,130	0,019	Chlru	148,530	8,900
	<i>rubrifilum</i>										
	<i>Dunaliella salina</i>	4,453	0,340	0,858	43,100	65,000	67,200	92,839	Dunsa	186,046	104,932
Cyanophyceae	<i>Aphanothece</i> sp.	0	0,037	0,035	0,745	6,000	13,200	5,082	Apha	204,372	85,629
	<i>Oscillatoria</i> spp.	0,011	0,001	0,062	0,008	0,300	0,900	0,223	Osci	179,240	80,850
	<i>Phormidium</i>	0	0,001	0,036	0	8,000	17,151	1,716	Phove	212,682	79,525
	<i>versicolor</i>										
	<i>Spirulina</i>	0	0,010	0,615	0,080	0,090	0	0	Spisu	111,664	46,270
Pennate diatoms	<i>Achnanthes</i>	0,002	0,004	0,009	0	0	0	0	Achbr	-	-
	<i>brevipes</i>										
	<i>Achnanthes</i>	0,018	0	0	0	0	0	0	Achin	-	-
	<i>inflata</i>										
	<i>Achnanthes</i> sp.	0,150	0,009	0,002	0,005	0	0	0	Achsp	49,649	14,584
	<i>Amphipleura</i> sp.	0,010	0,009	0,001	0,032	0	0	0	Amphpl	64,514	23,115
	<i>Amphiprora</i> sp.	0,012	0,037	0,003	0,003	0	0	0	Amppr	55,594	17,858
	<i>Amphora</i> sp.	0,007	0,005	0,055	0,125	0	0	0	Ampho	79,780	20,523
	<i>Cocconeis</i> sp.	0,003	0,001	0	0	0	0	0	Cocco	-	-
	<i>Cylindrotheca</i>	1,884	5,826	52,131	28,161	2,000	0,121	0	Cylca	102,163	68,028
	<i>closterium</i>										
	<i>Cymbella</i> sp.	0	0	0	0	0,003	0	0	Cymbe	-	-
	<i>Diploneis</i> sp.	0,014	0,004	0	0	0	0	0	Diplo	-	-
	<i>Donkinia</i> sp.	0,002	0	0	0,035	0	0	0	Donki	-	-
	<i>Epithemia</i> sp.	0,011	0,021	0,293	0,077	0,015	0	0	Epithe	82,294	28,571
	<i>Grammatophora</i>	0,012	0,006	0	0	0	0	0	Gramma	47,528	7,502
	sp.										
	<i>Gyrosigma</i> sp.	0,325	0,094	0,087	0,237	0	0	0	Gyros	69,315	21,875
	<i>Licmophora</i> sp.	0,001	0	0	0	0	0	0	Licmo	-	-
	<i>Navicula elegans</i>	0,006	0,044	0,011	0,075	0	0	0	Navel	70,412	19,320
	<i>Navicula</i>	0	0,003	0,125	0	0	0	0	Navne	89,274	15,556
	<i>neoventricosa</i>										
	<i>Navicula</i> spp.	45,359	0,669	0,065	0,493	0,200	0	0	Navsp	71,389	33,107

	<i>Nitzschia sigma</i>	0,009	0,014	0,179	3,690	0,300	0	0	Nitsi	94,047	38,562
	<i>Nitzschia spp.</i>	43,440	54,100	32,868	1,062	9,700	0,158	0	Nitsp	94,052	54,035
	<i>Nitzschia ventricosa</i>	0,025	0,015	0,015	0,048	0,030	0	0	Nitve	80,753	53,563
	<i>Pinnularia sp.</i>	0,216	0,335	0,038	0,429	0,015	0	0	Pinnu	68,839	27,836
	<i>Pleurosigma sp.</i>	0,129	0,083	0,008	0,524	0	0	0	Pleuro	66,571	21,503
	<i>Stenopterobia sp.</i>	0,004	0,013	0,010	0,626	0,003	0	0	Steno	92,459	39,867
	<i>Surirella sp.</i>	0,011	0	0,004	0,200	0	0	0	Suri	69,682	24,033
	<i>Synedra longissima</i>	0,016	0,012	0,069	0,407	0	0	0	Synlo	78,863	25,784
	<i>Synedra sp.</i>	0,018	0,196	0,005	0,540	0	0	0	Synsp	67,856	21,820
<hr/>											
Centric diatoms	<i>Actinoptychus sp.</i>	0,001	0	0	0	0	0	0	Acti	-	-
	<i>Coscinodiscus sp.</i>	0,004	0	0,009	0,005	0	0	0	Cosci	-	-
	<i>Diatomella sp.</i>	0	0,026	0,018	0	0,030	0	0	Diato	-	-
	<i>Thalassiosira mendiolana</i>	0,004	0,138	0,007	0	0	0	0	Thame	-	-
<hr/>											
Dinophyceae	<i>Akashiwo sanguinea</i>	0	0,167	0,065	0,037	0,003	0	0	Akasa	85,533	30,612
	<i>Amphidinium sp.</i>	0,005	0,061	0,001	0	0	0	0	Amphi	64,764	13,580
	<i>Glenodinium sp.</i>	0,015	0,013	0	0	0	0	0	Gleno	-	-
	<i>Gonyaulax sp.</i>	0,002	0,004	0,015	0,194	0	0	0	Gony	81,086	20,102
	<i>Gymnodinium spp.</i>	0,960	3,300	0,340	0,948	0,050	0	0	Gymno	73,992	34,366
	<i>Gyrodinium sp.</i>	0,031	4,030	0,090	0,032	0	0	0	Gyrod	71,875	18,978
	<i>Mesoporos sp.</i>	0,009	0,130	0	0	0,110	0	0	Meso	97,338	57,795
	<i>Oxyrrhis marina</i>	0,014	2,533	1,511	1,313	0	0	0	Oxyma	76,470	19,058
	<i>Peridiniopsis sp.</i>	0,002	0	0	0	0	0	0	Periop	-	-
	<i>Peridinium spp.</i>	0,262	24,23	8,17	14,90	0,050	0	0	Perium	77,595	32,010
	<i>Polykrikos sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	Poly	118,657	51,813
	<i>Prorocentrum compressum</i>	0	0,003	0	0	0	0	0	Prorcp	-	-
	<i>Prorocentrum concavum</i>	0	0,009	0,018	0,319	0	0,140	0	Prorcc	93,660	49,770
	<i>Prorocentrum gracile</i>	0,001	0,420	0,001	0,226	0	0	0	Prorgr	72,759	17,906
	<i>Prorocentrum lima</i>	0	0,031	0	0	0	0	0	Prorli	-	-
	<i>Prorocentrum micans</i>	0,001	0,931	0,005	0,059	0,003	0	0	Prormi	79,114	28,808

<i>Prorocentrum</i> sp.	0,006	0,053	0,015	0,296	0,009	0	0	Prorsp	87,552	38,739
<i>Protoperidinium</i> <i>achromaticum</i>	0	0,006	0	0	0	0	0	Protac	-	-
<i>Protoperidinium</i> <i>bipes</i>	0,011	0	0	0	0	0	0	Protbi	-	-
<i>Protoperidinium</i> <i>brevipes</i>	0	0,026	0	0	0	0	0	Protbr	-	-
<i>Protoperidinium</i> <i>claudicans</i>	0	0,006	0	0	0	0	0	Protcl	-	-
<i>Protoperidinium</i> <i>mite</i>	0,002	0	0	0	0	0	0	Protmi	-	-
<i>Protoperidinium</i> <i>pellucidum</i>	0,002	0	0	0	0	0	0	Protpe	-	-
<i>Protoperidinium</i> <i>sp.</i>	0,053	0,980	0,038	0,290	0	0	0	Protsp	70,449	21,636
<i>Protoperidinium</i> <i>sterni</i>	0,003	0	0	0	0	0	0	Protst	-	-
<i>Scrippsiella</i> <i>trochoidea</i>	0,019	0,150	0,027	0,311	0	0	0	Scritr	70,162	20,726
<i>Euglenophyceae</i> <i>Euglena</i> sp.	2,400	0,607	0,001	0	0,006	0	0	Eugle	47,894	11,778

3. L'analyse statistique STATICO

3.1. L'inter-structure

L'analyse STATICO est basée sur 18 variables environnementales et l'abondance de 64 espèces phytoplanctoniques. Les longueurs des flèches dans le graphique d'inter-structure montrent que les prélèvements effectués le 10 mars et le 25 mai sont les plus influents dans l'analyse, suivies par le 6 décembre, le 10 mai, le 9 novembre et le 30 mars (Fig. 32). Généralement, la structure est faible en été, forte au printemps et modérée en automne et en hiver.

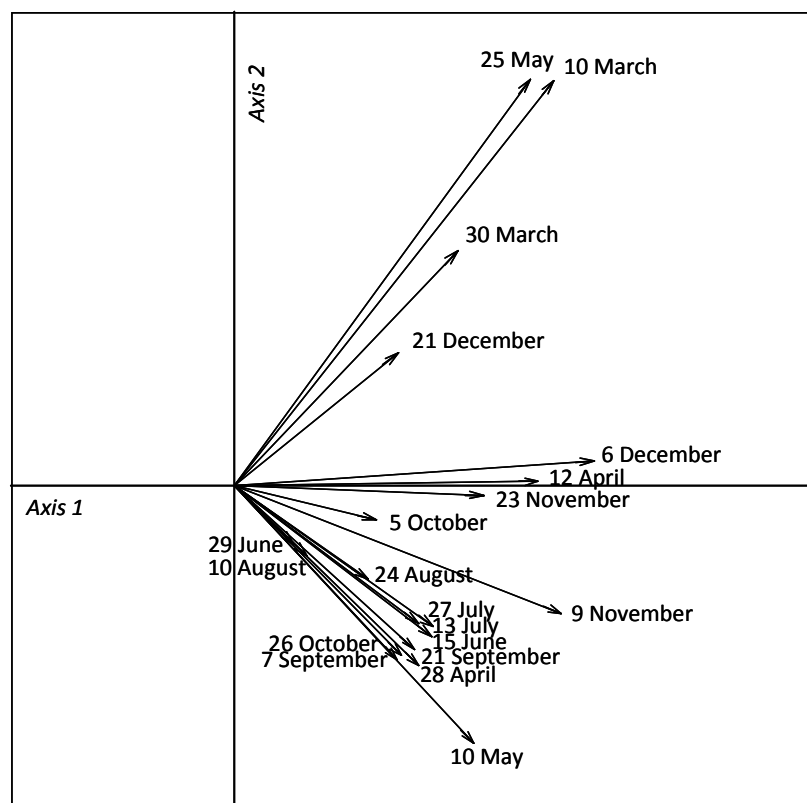


Figure 32. L'analyse STATICO présentant la carte factorielle de l'inter-structure. La longueur des flèches indique l'importance des dates d'échantillonnage, de juin à décembre 2010 et de mars à mai 2011

3.2. Le compromis

Le facteur compromis de l'analyse STATICO est représenté dans la figure 33. Le premier axe est clairement dominant, expliquant 63,4 % des variables contrairement au deuxième axe qui n'explique que 10,7 % des variables. Compte tenu des variables environnementales (Fig. 33A), le premier axe décrit les gradients dominants qui sont : la salinité, la densité et les matières en suspension. Ils sont placés sur le côté gauche du graphique (Fig. 33A). Par contre, le gradient de l'oxygène dissous, localisé sur le côté droit, est en corrélation négative avec la salinité.

Le deuxième axe présente un gradient de pigments photosynthétiques ayant des valeurs élevées sur la partie inférieure du graphique, le gradient N / P, avec des ions azotés sont localisés sur la partie inférieure du graphique, alors que les ions phosphates sont localisés sur la partie supérieure du graphique (Fig. 33A). Les caroténoïdes, les silicates et les éléments nutritifs, situés sur le côté gauche, montrent une corrélation positive avec la salinité, tandis

que la Chl *a*, *b*, *c*, et le pH, situés sur le côté droit, présentent une corrélation négative avec la salinité.

Si nous prenons le compromis « espèce » (Fig. 33B), la plupart d'entre elles, essentiellement les diatomées et les Dinophyceae, avec un optimum de salinité bas ou moyen, sont situées sur le côté opposé à la salinité. Seulement les cyanobactéries et les Chlorophycées, ayant un optimum de salinité élevé, (surtout la Chlorophycée *D. salina*) sont situées du même côté que la salinité (Fig. 33, Tableau 4). Nous notons également que l'abondance de *D. salina* est fortement corrélée avec les caroténoïdes. En outre, la Chl *c* et la position moyenne des diatomées sont superposées. L'oxygène et le pH sont du même côté que la majorité des espèces, contrairement aux éléments nutritifs qui sont relativement abondants sur le côté opposé. La température n'avait pas un rôle majeur. La position moyenne de chaque bassin projetée sur le graphique est fortement influencée par le sel. En effet, les bassins A5, A16, C21, C41, M2, B1 et TS possèdent des ordonnées allant de droite à gauche le long du premier axe correspondant à la concentration croissante en sel.

La coordination des bassins par rapport au premier axe est la même pour les espèces et pour les variables de l'environnement, ce qui indique que la composition des communautés phytoplanctoniques dépend surtout du niveau de la salinité des différents bassins.

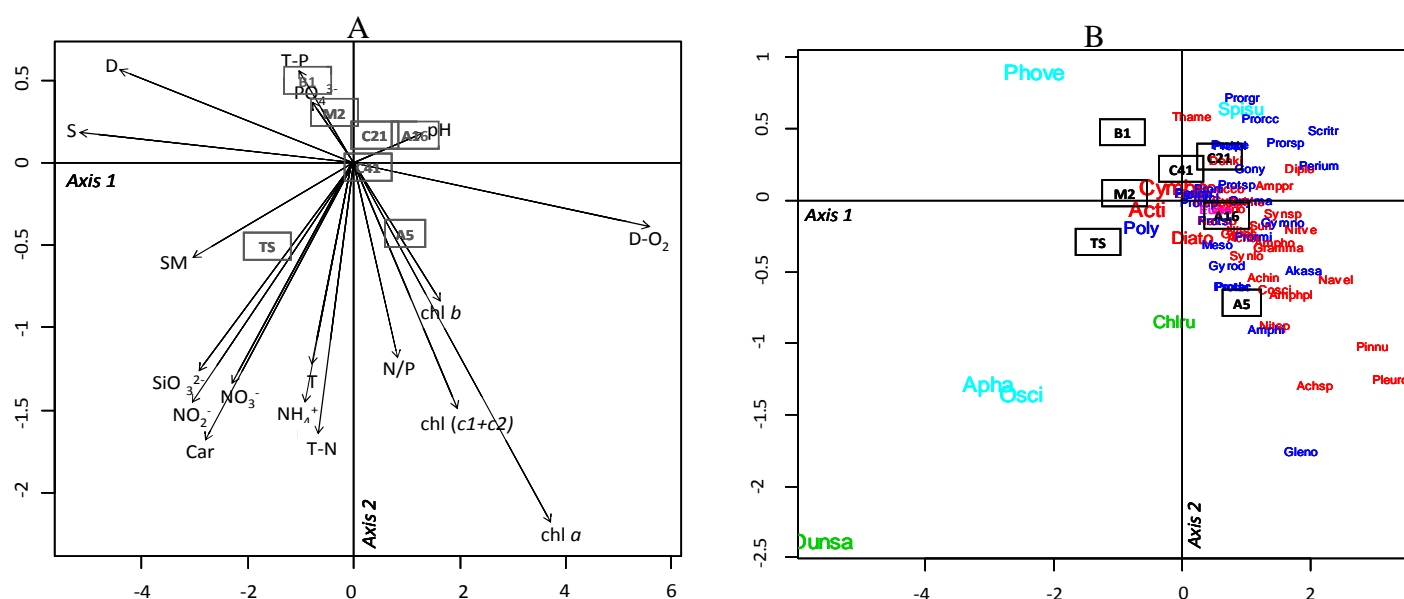


Figure 33. Carte factorielle du compromis de l'analyse STATICO. Les abréviations des variables sont indiquées dans le tableau 3. Cadre A: projection moyenne des variables pour chaque bassin. Cadre B: projection moyenne des espèces pour chaque bassin. Les abréviations des espèces sont indiquées dans le tableau 4. Les couleurs sont utilisées pour distinguer les classes: vert ; Chlorophyceae; bleu pâle : Cyanophyceae; bleu foncé : Dinophyceae; rouge : Bacillariophyceae; violet : Euglenophyceae. La taille des lettres indique le niveau de tolérance des espèces. La superposition des deux cartes nous renseigne sur la partie stable des relations entre l'environnement et phytoplancton

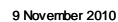
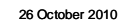
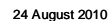
3.3. Les trajectoires

Au-delà de cette tendance générale décrite ci-dessus via le compromis, les relations entre les facteurs de l'environnement et les espèces varient au fil du temps. Les projections des variables environnementales (Fig. 34A) et des espèces (Fig. 34B) sur les axes du compromis à chaque date, permettent de visualiser les variations. En ce qui concerne les variables environnementales, les paramètres abiotiques étaient dominants dans la structure en été et en hiver, avec une forte influence de la salinité, la densité et parfois des ions phosphates (ortho-phosphates et phosphore total) ou silicates sur le côté gauche du graphique, tandis que l'oxygène dissous et le pH sur le côté droit. Les pigments photosynthétiques sont localisés généralement près de l'origine de la carte factorielle pendant ces saisons, soulignant la faible influence du phytoplancton. En revanche, à l'automne, les chlorophylles, situées sur le côté droit de la carte factorielle, avaient une forte influence, indiquant le développement du phytoplancton dans les bassins les moins salés. Au printemps, les ions azotés, situés sur le

côté gauche de la carte factorielle, présentent une forte influence ainsi que pour les caroténoïdes indiquant le développement de Chlorophyceae dans les bassins les plus salés. Les espèces de diatomées et de Dinophyceae avaient une forte influence quelle que soit la saison, et les espèces dominantes changent à chaque date. Les Cyanophycées et les Chlorophycées avaient une forte influence en automne et en hiver, mais *D. salina* possède une forte influence au printemps. Les diatomées et Dinophyceae ont été le plus souvent situées sur le côté droit de la carte factorielle, alors que les Chlorophycées et Cyanophycées sont localisées sur le côté gauche, indiquant la stabilité relative de la répartition des classes dans les différents bassins, par rapport au gradient croissant de salinité pendant toute l'année.

De façon générale, les projections des bassins (Fig. 35) montrent une faible co-structure (relation) en été, la majorité des projections étant assez proche de l'origine de la carte factorielle. Le reste de l'année, la co-structure entre l'environnement et des espèces était plus forte mais variable. Généralement, nous observons une structure solide pour les bassins les plus salés au printemps et pour les bassins les moins salés en automne et en hiver. Les projections des bassins, analysées en parallèle avec les projections des variables de l'environnement et des espèces (Fig. 35), permettent d'identifier les facteurs structurants (les plus influençant) à chaque date. Pour chaque bassin, le point noir indique la projection des variables environnementales tandis que le cercle indique la projection des espèces. De fortes variations sont dues soit à certaines variables environnementales ou à certaines espèces phytoplanctoniques en fonction de la saison pour chaque bassin. La forte co-structure des bassins les plus salés au printemps est due à certaines variables environnementales, à savoir les ions azotés qui stimulent le développement d'espèces du phytoplancton halophiles (Fig. 35: le 10 mars et le 25 mai). En outre, cyanobactéries et Chlorophyceae (*D. salina*) ont cependant un rôle important dans le bassin TS le 30 Mars. Pour les autres bassins, la co-structure est forte, sur le côté droit de la carte factorielle. Cette forte co-structure est souvent due à une prolifération d'un petit nombre d'espèces phytoplanctoniques quelle que soit la saison : les diatomées (dans C21 le 15 juin, dans A5 le 5 octobre) ou les Dinophycées (dans A5, le 9 novembre, dans A16 le 6 décembre). Outre ces variations globales, des événements ponctuels peuvent également avoir une influence considérable. A titre d'exemple, le passage de TS en bas de la carte factorielle le 27 juillet est dû à une augmentation importante et ponctuelle de la quantité des matières en suspension.

A



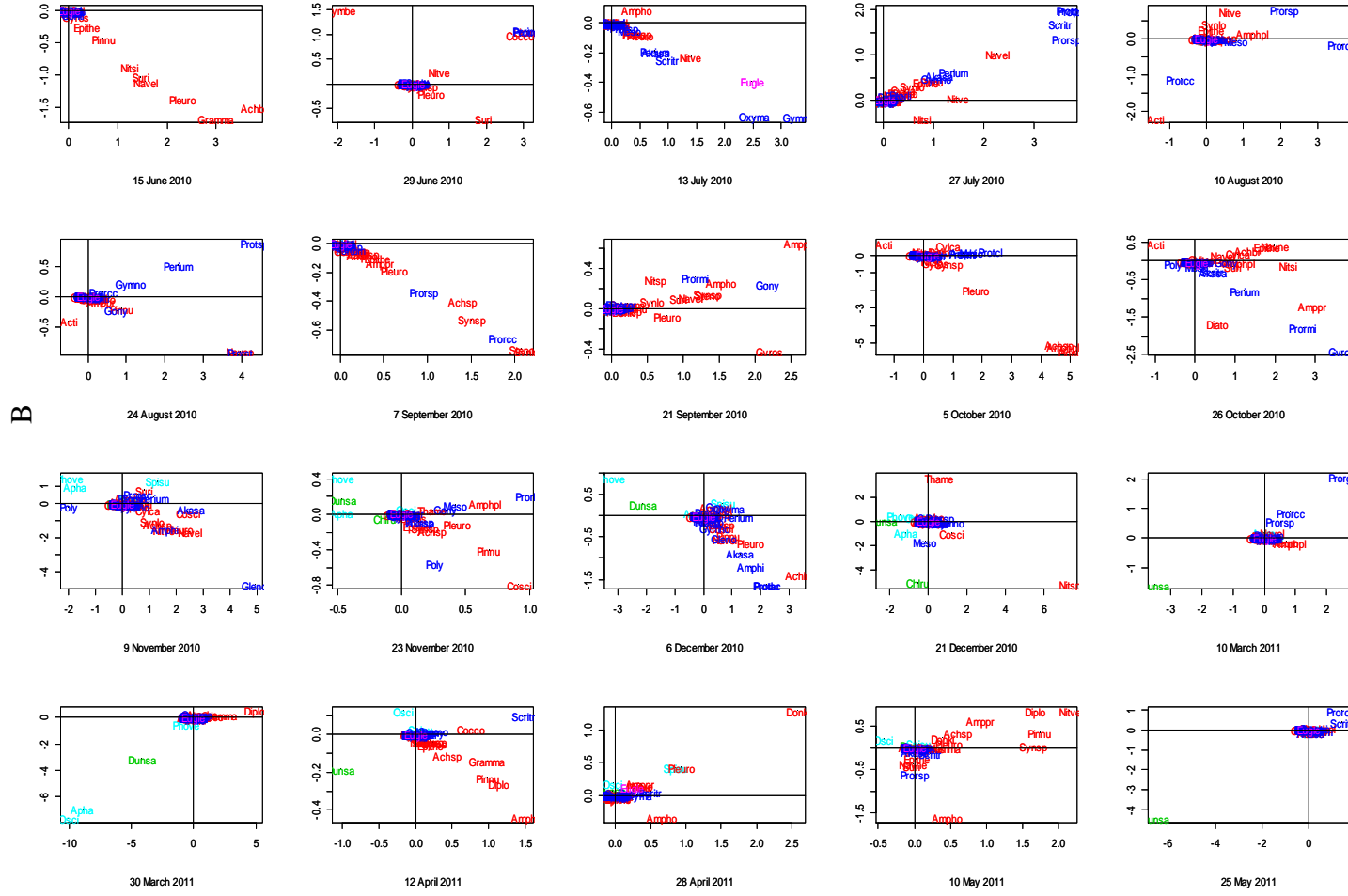


Figure 34. Analyse STATICO présentant les trajectoires des variables environnementales et des espèces. A- une projection des variables environnementales sur la carte factorielle à chaque date. Les abréviations des variables sont indiquées dans le tableau 3. B-projection des espèces sur la carte factorielle à chaque date. Les abréviations des espèces sont indiquées dans le tableau 5. Les couleurs sont utilisées pour distinguer les classes (voir Figure 36, tableau 5)

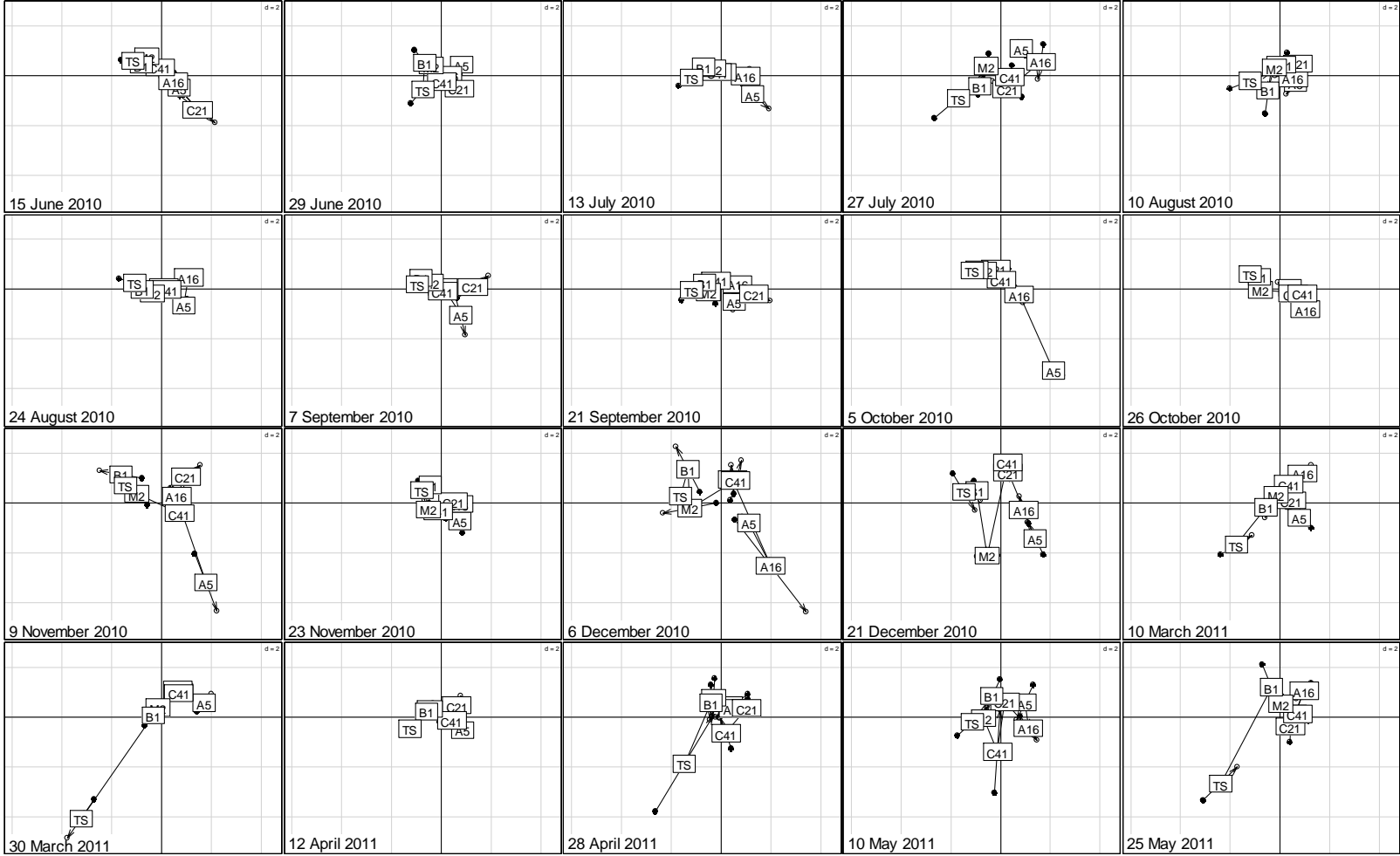


Figure 35. Analyse STATICO montrant les trajectoires des différents bassins. Projection des bassins d'échantillonnage sur la carte factorielle à chaque date. Pour chaque bassin, le point noir indique la projection des variables environnementales et le cercle indique la projection de l'espèce

4. Discussion

Le marais salant de Sfax présente des caractéristiques communes rencontrées dans la majorité des salines (Dolapsakis et al., 2005; Oren, 2009; Asencio, 2013) : un gradient croissant de salinité (Oren, 2009; Chatchawan et al., 2011; Abid et al., 2008; Nagasathya et Thajuddin, 2008; Madkour et Gaballah, 2012; Asencio, 2013), la densité du phytoplancton en corrélation avec la salinité (Khemakhem et al., 2010; Asencio, 2013), le pH relativement basique (Dolapsakis et al., 2005; Chatchawan et al., 2011; Kobbi-Rebai et al., 2013) qui reflète le bon fonctionnement des espèces photosynthétiques telles que les micro-algues, les cyanobactéries et les macro-algues (Ayadi et al., 2004), l'oxygène dissous inversement corrélé à la salinité (Debelius et al., 2009; Asencio, 2013), une forte turbidité au niveau des bassins de saturation due à la cristallisation (Amdouni, 1987) et à la dégradation de la matière organique à partir des bassins en amont (Davis et Giordano, 1996; Ayadi et al., 2002) et, enfin, la concentration en éléments nutritifs qui augmente sous l'effet de l'évaporation (Oren, 2009). Malgré la contrainte du sel, il y a une grande diversité des taxons du phytoplancton dans la saline de Sfax. Cependant, la diversité du phytoplancton diminue lorsque la salinité augmente, ceci est confirmé par la diminution de l'indice de diversité H' (Dolapsakis et al., 2005; Elloumi et al., 2007; Nagasathya et Thajuddin, 2008; Asencio, 2013). Par ailleurs, nous pouvons constater que la grande majorité (96%) des espèces prélevées en surface sont pélagiques.

L'analyse statistique STATICO confirme que le sel est le principal facteur de structuration des communautés phytoplanctoniques dans les marais salants. En effet, le premier axe de la carte factorielle du compromis met en évidence le gradient de salinité, avec des valeurs élevées en sel du côté gauche de la carte factorielle et des valeurs faibles en sel du côté droit. La majorité des espèces sont recensées principalement dans les bassins les moins salés, comme l'indique leur position : le côté droit de la carte factorielle. En effet, les premiers bassins de faible salinité abritent de nombreuses espèces de diatomées, de Dinophyceae et rarement des Euglenophyceae.

Les bassins les plus salés hébergent quelques espèces de Chlorophycées et de Cyanophycées, en particulier la micro-algue verte *D. salina* et les cyanobactéries *Aphanothece* sp., *P. versicolor* et *Oscillatoria* sp. Ces espèces sont les mieux adaptées au sel et elles se trouvent dans les bassins les plus salés dans différentes salines (DasSarma et Arora 2001; Dolapsakis et al., 2005; Oren, 2009; Chatchawan et al., 2011). La répartition des différentes classes phytoplanctoniques le long du gradient de salinité dans le marais salant de

Sfax est similaire à celle rencontrée dans la plupart des marais salants (Dolapsakis et al., 2005; Oren, 2009; Montoya, 2009; Nagasathya et Thajuddin, 2008; Khemakhem et al., 2010; Chatchawan et al., 2011; Madkour et al., 2012; Asencio, 2013). La répartition des différentes espèces dans les marais salants reflète leur capacité à se développer dans des eaux plus ou moins salées. Dans notre étude, nous pouvons définir trois catégories de taxons :

- * (i) les espèces qui vivent dans un intervalle de salinité inférieure à 100.
- * (ii) les espèces ayant un intervalle de salinité entre 100 à 200.
- * (iii) les espèces possédant un intervalle de salinité au-delà de 200.

DasSarma et Arora classent les espèces comme légèrement, modérément ou très halophiles, en fonction de leur besoin en NaCl (DasSarma et Arora, 2001). Chatchawan et al. (2011) ont défini les espèces halophiles, au sens strict, comme étant les espèces qui exigent du sel, tandis que les espèces halotolérantes sont capables de se développer en présence de NaCl sans qu'elles en aient besoin. Les espèces trouvées dans les marais salants de Sfax ne présentent pas d'exigence vis à vis du sel. Ceci est confirmé par le fait que certaines espèces peuvent être signalées à la fois dans les bassins les moins salés, dans les bassins modérément salés et parfois dans les bassins très salés. De plus, la plupart des espèces présentent un optimum de salinité élevée et également une valeur de tolérance de la salinité élevée. En résumé, les espèces phytoplanctoniques de la saline de Sfax sont des espèces légèrement, modérément ou extrêmement halotolérantes selon les classes et même selon le genre : les valeurs optimales de salinité étant de 47-100, 100-200, au-delà de 200, respectivement.

Généralement, les diatomées, les Dinophycées et les Euglenophycées sont la plupart du temps des espèces peu ou moyennement halotolérantes, alors que les Chlorophyceae et les Cyanophyceae sont des espèces extrêmement halotolérantes. Les intervalles de salinité, où sont signalées ces espèces, sont très semblables à ceux délimités dans plusieurs marais salants. Certaines diatomées comme *Amphora* spp., *Navicula* spp. *Nitzschia* spp, *C. closterium*, *Pleurosigma* spp. et *Synedra* spp. ont été trouvées dans un intervalle de salinité allant de 60 à 140 (DasSarma et Arora, 2001 Dolapsakis et al., 2005; Nagasathya et Thajuddin, 2008), bien que le seuil en concentration en NaCl où les diatomées sont capables de se développer, est égal à 171 (DasSarma et Arora, 2001). Les Dinophyceae comme *Gymnodinium* spp. *Gyrodinium* sp. et *O.marina* prolifèrent dans un intervalle de salinité qui varie entre 60 et 94 (Dolapsakis et al., 2005). Les cyanobactéries *Oscillatoria* sp., *Aphanothece* sp., *P. versicolor* et *S. subsalsa* sont capables de survivre à des salinités allant de

114 à 285 tandis que la Chlorophyceae *D. salina* est capable de survivre dans des bassins d'évaporation (DasSarma et Arora, 2001; Dolapsakis et al., 2005; Nagasathya et Thajuddin, 2008; Oren, 2009; Chatchawan et al., 2011). Le niveau de tolérance dépend des mécanismes d'adaptation ou d'acclimatation des espèces au sel (Rai et Gaur, 2001). Certaines micro-algues extrêmement halotolérantes comme *D. salina* synthétisent des métabolites de stress tels que la proline, la glycine bêtaïne et le glycérol qui assurent l'équilibre osmotique et permettent l'expulsion à l'extérieur des cellules les ions sodium en excès (DasSarma et Arora, 2001; Mishra et al., 2008; Oren, 2009). De plus, l'expulsion du sodium via des transporteurs d'ions assure l'homéostasie chez les micro-algues (Rai et Gaur, 2001). Chez les cyanobactéries, le mécanisme d'adaptation détermine le potentiel de résistance de la cellule. Les souches, ayant une résistance au sel allant jusqu'à 40, accumulent le saccharose et le tréhalose, les souches tolérant des concentrations en sel atteignant 100 accumulent le glycosylglycérol, et les souches tolérant une salinité de l'ordre de 156, comme *Aphanothece* sp., *P. versicolor* et *Oscillatoria* sp. accumulent la glycine-bêtaïne ou le glutamate bêtaïne (DasSarma et Arora, 2001; Karandashova et Elanskaya, 2005; Nagasathya et Thajuddin, 2008; Oren, 2009). Les diatomées dont *Amphora*, *Nitzschia* et *Navicula* sont des espèces couramment rencontrées mais rarement abondantes dans les environnements hyper-salés. Bien que la régulation osmotique n'ait pas été étudiée en détail chez les diatomées, l'accumulation de la proline, des oligosaccharides a été signalée chez certaines espèces (DasSarma et Arora, 2001).

Les positions des pigments photosynthétiques et des espèces du phytoplancton sur la carte factorielle de l'analyse STATICO indiquent une bonne corrélation entre différentes espèces du phytoplancton avec les pigments qui leur sont caractéristiques. En effet, la Chl *a*, trouvée chez toutes les classes et les espèces, est située sur la droite de la carte factorielle, comme la plupart des espèces. Cela est dû au fait que l'abondance du phytoplancton est la plus élevée dans les bassins les moins salés. La Chl *c*, caractéristique des diatomées, est superposée avec l'emplacement moyen des diatomées. Les caroténoïdes sont superposés avec l'emplacement de la Chlorophycée *D. salina* ayant une production importante de β carotène (Gómez et González, 2005; Mendoza et al., 2008, Chen et Jiang, 2009). Dans notre étude, la concentration élevée en caroténoïdes est en grande partie due à *D. salina* qui domine dans les bassins salés en mars (Dolapsakis et al., 2005). Cependant, des bactéries halophiles et des Archaea produisent également des caroténoïdes et amplifient cet effet (DasSarma et Arora, 2001; Elloumi et al., 2007; Oren, 2009). Donc les pigments peuvent nous renseigner

généralement sur la présence des différentes catégories du phytoplancton (Strain et coll., 1943; Suzukit et Ishimaru, 1990; Lopez-Flores et al., 2006).

La localisation de l'oxygène, dissous du côté droit de la carte factorielle, est également en liaison avec la distribution du phytoplancton. Selon Debelius et al. (2009), l'oxygène dissous peut être mis en relation avec l'intensité de la photosynthèse et de la respiration lorsque la profondeur d'eau est faible. Dans notre étude, la profondeur ne dépasse pas 70 cm. De plus, l'oxygène dissous est situé sur le côté droit de la carte factorielle, correspondant à la plus forte abondance du phytoplancton. Ceci est cohérent, puisque l'activité photosynthétique du phytoplancton libère de l'oxygène. En outre, les bassins du côté de la mer sont plus oxygénés que ceux plus éloignés, puisque l'eau de mer pénètre et enrichit les premiers bassins en oxygène. L'ensemble de ces facteurs explique la localisation de l'oxygène dissous dans l'extrême-droite de la carte factorielle.

Les éléments nutritifs sont localisés du côté opposé à la majorité des espèces phytoplanctoniques. Ceci est probablement dû au fait que le phytoplancton incorpore les nutriments pour assurer leur survie (Falkowski, 2000; Yin et al., 2000; Arrigo, 2005; Sterner et al., 2008). Le rapport nitrate/phosphate (N/P), requis par les espèces du phytoplancton, reste un paramètre fondamental dans l'écologie marine. Ainsi le rapport de Redfield (16:1) est utilisé comme référence (Arrigo, 2005). Dans notre étude, le rapport N/P est faible, ce qui est en accord avec les études antérieures menées sur la saline de Sfax (Elloumi et al., 2007; Khemakhem et al., 2010; Kobbi-Rebai et al., 2013). L'azote inorganique est souvent rare dans les marais salants méditerranéens en raison du processus de dénitrification. En effet, les bactéries phototrophes modérément halophiles comme *Chlorobium limicola* et *C. phaeobacteriales*, qui prolifèrent dans cet environnement, fixent l'azote (DasSarma et Arora, 2001).

Arrigo (2005) optimise des modèles d'assimilation des nutriments par le phytoplancton et conclut que le rapport de Redfield n'est pas une valeur optimale universelle, mais représente une valeur moyenne pour divers groupements de phytoplancton océaniques qui se développent dans différentes conditions et qui ont des stratégies de croissance différentes ; ce rapport n'est donc pas approprié pour d'autres écosystèmes aquatiques comme les salines. En milieu salé, les taux de phosphate élevés semblent être favorables au développement du phytoplancton (Dolapsakis et al., 2005). Ces constatations peuvent expliquer la prolifération des micro-algues rencontrées dans la saline de Sfax malgré le faible rapport nitrate / phosphate, en plus de la mixotrophie de certaines micro-algues (Lopez-Flores

et al., 2006). Les nutriments sont également structurés selon le deuxième axe de l'analyse STATICO, avec le phosphate sur la partie supérieure de la carte de factorielle et avec les ions azotés sur la partie inférieure. Le rapport nitrate / phosphate pourrait être le second facteur structurant (influençant) les communautés phytoplanctoniques. Une étude expérimentale de l'enrichissement en nutriments pourrait aider à mieux comprendre cette relation. Ce type d'expériences a déjà été fait dans d'autres écosystèmes (Ortega-Mayagoitia et al., 2003; Dolapsakis et al., 2005).

Le compromis, discuté ci-dessus, décrit la situation moyenne, tandis que les trajectoires se concentrent sur la variation dans le temps des facteurs biotiques et abiotiques et des relations entre eux, dans chaque bassin.

La composition des communautés phytoplanctoniques varie avec les conditions environnementales. Certaines diatomées et/ou des espèces de Dinophycées pullulent ponctuellement, pendant toute l'année, surtout dans les bassins les moins salés, ce qui est cohérent avec les résultats d'autres auteurs (Gilabert, 2001; Abid et al., 2008; Khemakhem et al., 2010).

Nous n'avons pas pu relier chaque événement de bloom à des conditions environnementales particulières. Etant donné que les espèces sont nombreuses dans ces bassins, il est fort probable que de très légères variations environnementales entraînent un changement de l'espèce dominante, ce qui induit des successions rapides au sein des communautés. Cette dynamique peut être le résultat de divers facteurs environnementaux, y compris les éléments nutritifs, et peut-être aussi, juste des événements stochastiques (Ortega-Mayagoitia et al., 2003). Dans les bassins les plus salés, les Chlorophyceae et les Cyanophyceae prospèrent pendant l'automne et l'hiver, cette constatation est en accord avec ce qui a été montré dans d'autres écosystèmes (Montoya, 2009; Bazzuri et al., 2010; Chatchawan et al., 2011). Le développement de la micro-algue verte *D. salina* persiste au printemps, comme observée dans d'autres salines (Dolapsakis et al., 2005; Stephens et Gillespie; 1976). Dans notre étude, cette prolifération est due à une augmentation des ions azotés, en particulier les nitrates. Cette augmentation pourrait aussi être expliquée par une augmentation de l'activité de nitrification bactérienne (Madkour et Gaballah, 2012; Asencio, 2013) au printemps.

Le résultat qui précède, renforce la constatation que les nutriments influencent la distribution et la dynamique du phytoplancton. Les différences physiologiques entre les

différents taxons du phytoplancton dans l'assimilation des nutriments (Lopez-Flores et al., 2006) sont compatibles avec cette hypothèse. Plusieurs études ont montré le rôle essentiel des nutriments dans les milieux salins, notamment au niveau des interactions trophiques (Moll, 1977; Davis, 2000; Ortega-Mayagoitia et al., 2003; Salm et al., 2009). Nitrates et phosphates, en particulier, peuvent être souvent des facteurs limitatifs pour le phytoplancton de façon générale, et pour *D. salina* en particulier (Dolapsakis et al., 2005; Salm et al., 2009). Lopez-Flores et al. (2006) a souligné que les Chlorophycées sont particulièrement sensibles à la limitation en nitrates, car, contrairement à certaines autres classes de phytoplancton, elles ne sont pas mixotrophes et elles dépendent donc en grande partie des nitrates. Par ailleurs, (Croft et al., 2012) ont montré l'importance des interactions entre le phytoplancton et les bactéries, ces dernières jouant un rôle prépondérant dans la minéralisation de la matière organique benthiques et pélagiques. En effet, ces dernières libèrent dans le milieu des molécules organiques telles que la vitamine B12 qui stimulent la prolifération des micro-algues. Une étude complémentaire pourrait prendre en considération les interactions entre eucaryotes et procaryotes.

Chapitre II : Détermination des espèces étudiées

Trois espèces ont été isolées des bassins TS, C41 et C21 de la saline de Sfax : *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor*, respectivement.

Ces espèces ont été identifiées à l'aide d'un microscope optique (Fig. 36, 37). Il est à noter que, via le microscope optique, la cyanobactérie a été identifiée comme étant *Phormidium* sp. Le Professeur Alain Couté, spécialiste des cyanobactéries au Muséum National de Sciences Naturelles de Paris, a identifié par microscopie l'espèce comme étant *P. versicolor*. En parallèle, une identification moléculaire à l'aide de différents gènes (*rbcL*, 18S, 8,5, et 16S), a été réalisée afin de discriminer et caractériser les espèces.

1. Identification par microscopie optique

D. salina (Teodoresco, 1905) est une espèce halotolérante ayant une croissance optimale à une salinité supérieure à 6 % NaCl et capable de synthétiser du β -carotène en grande quantité. La cellule présente une symétrie radiale. La forme mobile est biflagellée et insérée à l'extrémité antérieure de la cellule. Un seul chloroplaste occupe la majeure partie postérieure du volume de la cellule.

C. closterium (Reimann et Lewin, 1964) est une diatomée pennée (deux raphés) appartenant à la famille des Bacillariaceae. C'est une forme pélagique solitaire et cosmopolite

mais parfois épiphyte. La frustule présente une forme fusiforme non tordu au niveau du rostre. La majorité du genre *Cylindrotheca* présente des frustules tordues, selon l'axe apical. L'absence de cette torsion ainsi que les stries à la surface des valves sont des caractères distinctifs de cette espèce. La valve est légèrement silicifiée. Chaque cellule est dotée de deux chloroplastes. *C. closterium* a été intitulé *Nitzschia closterium*. Les travaux de Medlin (1990) montrent que *Cylindrotheca* n'appartient pas au genre *Nitzschia*. Plusieurs travaux ont été effectués sur cette espèce au niveau de divers milieux marins, afin de rectifier leur nom. L'identification de *C. closterium* présente plusieurs ambiguïtés afin d'être correctement identifiée. A l'examen d'un échantillon brut, nous trouvons des difficultés pour distinguer entre *C. closterium* et *Nitzschia longissima*.

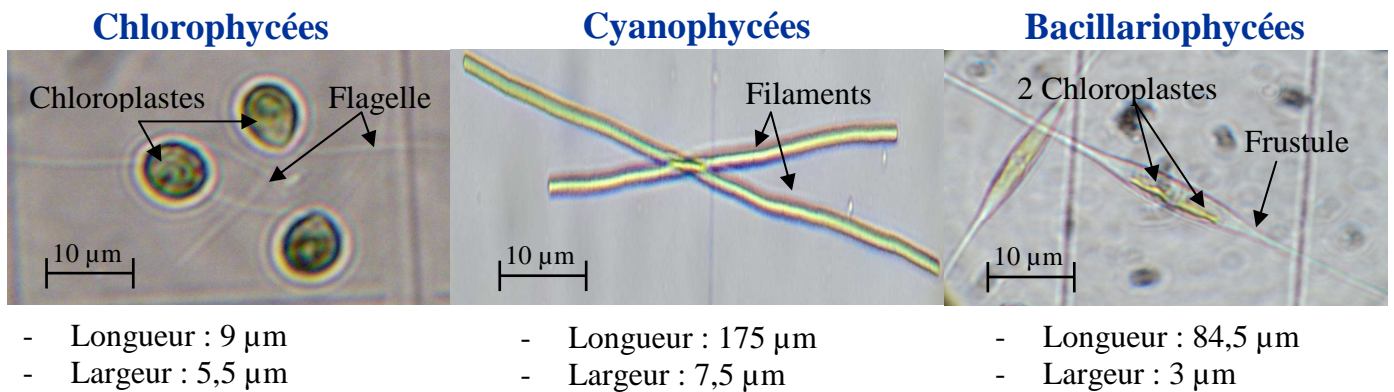


Figure 36. Photographies de *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor* prises en microscopie optique (G x40)

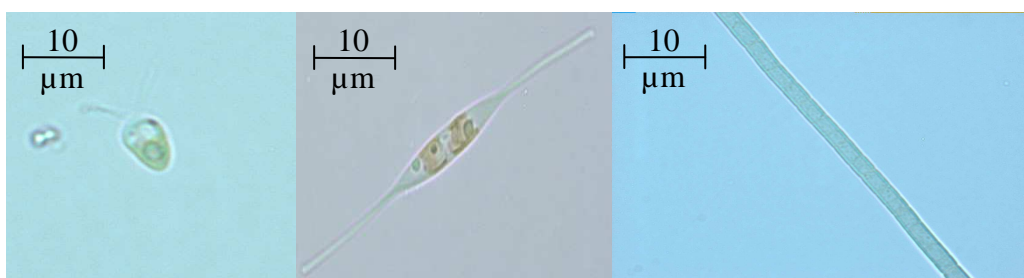


Figure 37. Photographies de *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor* respectivement prises en microscopie optique (G x100)

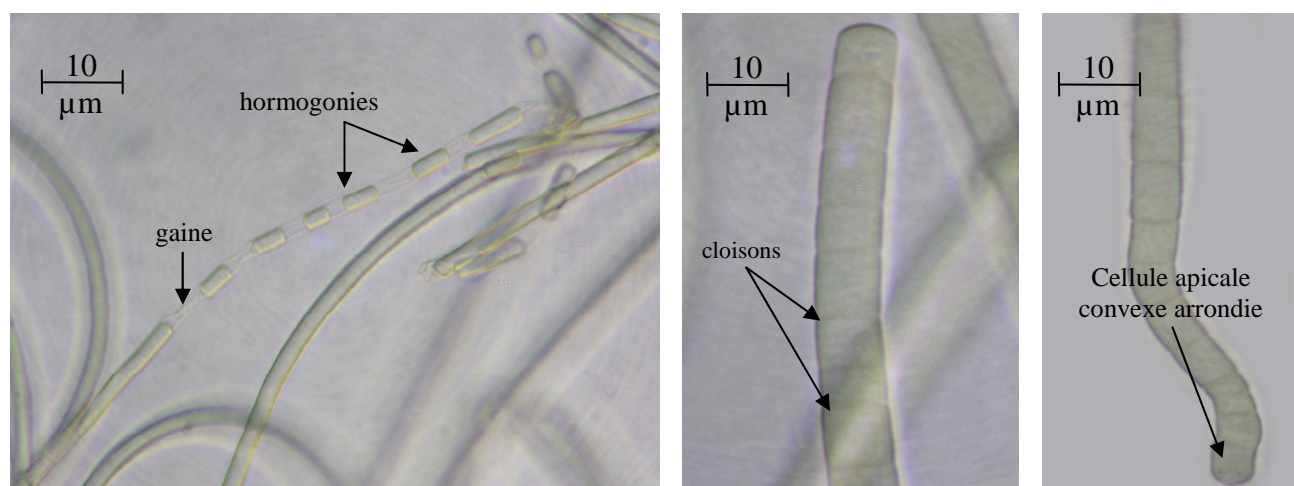


Figure 38. Photographies de *P. versicolor* effectuées par PR. Alain Couté (G x100)

Tableau 5. Caractères taxonomiques distinctifs entre les deux cyanophycées (cyanobactéries) :
Leptolyngbya cebennensis et *Phormidium versicolor*.

Caractères	<i>Leptolyngbya cebennensis</i>	<i>Phormidium versicolor</i>
Largeur cellulaire	3,5-4µm	(2,5)2,8-3,2(4) µm
Longueur cellulaire	1-2,5(3) µm	2-6,5 µm
Constrictions aux cloisons	Néant	néant
Granulations aux cloisons	Néant	néant
Gaine	mince, incolore	mince, incolore
Cellule apicale	non atténuée, convexe	non atténuée, convexe
Calyptra	néant	néant
milieu	eaux douce et thermale, subaérophytique	eaux douce et saumâtre

Rapport d'analyse du Pr. Alain Couté (18 janvier 2012) : l'examen microscopique d'une petite partie du revêtement vert pâle, accumulée dans le fond de la partie conique du tube de culture, a révélé la présence de filaments fins (diamètre : 4- 4,5µm), cloisonnés et de couleur grisâtre, entremêlés. Les filaments sont constitués d'une seule file de cellules (= unisériés) et

non ramifiés. Il n'y a pas de constriction (ou elle est à peine perceptible) au niveau des cloisons intercellulaires. Une gaine très fine, incolore bien visible lors de la formation d'hormogonies (fragments de filament destinés à se détacher et à assurer la multiplication des individus), enveloppe l'ensemble du microorganisme. Les dimensions des cellules sont de : 4 - 4,5 μm de largeur et 3 - 6 μm de longueur, et dans la majeure partie des cas, elles sont isodiamétriques. Les cellules apicales ne sont pas atténuées et leur extrémité libre est convexe et arrondie. Avec les caractères énoncés ci-dessus, deux taxons peuvent correspondre à l'échantillon fourni, à savoir *Leptolyngbya cebennensis* (Gomont) Umezaki et Watanabe 1994 ou *Phormidium versicolor* Wartmann in Rabenhorst 1861 ex Gomont 1892. Les iconographies fournies dans la littérature sont très similaires et le tableau 6, qui regroupe les caractères de ces deux micro-algues facilite la comparaison. Ce sont donc la longueur cellulaire et la présence en eau saumâtre qui permettent d'identifier l'échantillon fourni comme *P. versicolor* (Fig. 38; Tableau 5). Les morphologies étant très similaires, seuls les caractères marqués par une trame grise peuvent permettre de faire un choix. La longueur cellulaire correspond à la longueur rencontrée chez cette espèce (2- 6,5 μm chez *P. versicolor* et 3-6 μm pour le microorganisme en question). L'environnement saumâtre, signalé uniquement pour *P. versicolor*, sans précision pour autant de la concentration en sels, est en accord avec l'échantillon récolté. Il s'agit donc de *Phormidium versicolor* Wartmann in Rabenhorst 1861 ex Gomont 1892.

2. Identification moléculaire

Actuellement, il existe des outils de biologie moléculaire ayant la capacité de discriminer les espèces. Les publications de D'Alelio et al. (2009) et Hamsher et al. (2011) ont permis de définir des amorces pour rechercher les gènes *rbcL*, *8S* et *18S*. Ces amorces ont été utilisées pour déterminer les deux micro-algues isolées de la saline de Sfax. En parallèle, d'autres amorces ont été déterminées à partir d'alignements de séquences des gènes codant le *18S*, *16S* et *5,8S*. Les gènes *18S* et *16S* sont des gènes codant l'ARN ribosomal et ces gènes ne sont pas traduits en protéines. Les *ITS1* et *2*, qui délimitent le gène *5,8S* qui code de l'ARN ribosomal, sont très conservées chez différentes espèces. Le gène *rbcL* code la grande sous-unité de la ribulose biphosphate carboxylase, enzyme qui joue un rôle clé dans la photosynthèse.

2.1. *Dunaliella salina*

Les amplifications avec les amorces 18S n'ont pas donné de résultats. Pour le gène ITS, l'amplification PCR avec les amorces ITS1 et ITS2 nous a donné un fragment de 700 pb (Fig. 39). Le fragment amplifié correspond à la taille attendu qui varie entre 778 et 798 pb chez *Pseudo-nitzschia multistriata*. Après séquençage, les interrogations dans les banques de données (NCBI) montrent une identité en acides nucléiques de 100 % avec ITS de *D. salina* (souche israélienne). Le numéro d'accèsion dans la banque de données NCBI est DQ116743.1. L'alignement de la séquence obtenue avec celle de *D. salina* (souche israélienne) est présenté dans la figure 40. Concernant le gène rbcL, le fragment amplifié de taille 300 pb ne correspond pas à la taille attendue (1400 pb). Après séquençage et interrogation des banques de données (NCBI), la séquence correspond à une nitrate réductase chez *D. salina* (AY567972.1). Il est à remarquer que les amorces sont retrouvées sur le fragment amplifié ce qui montre bien une amplification aspécifique.

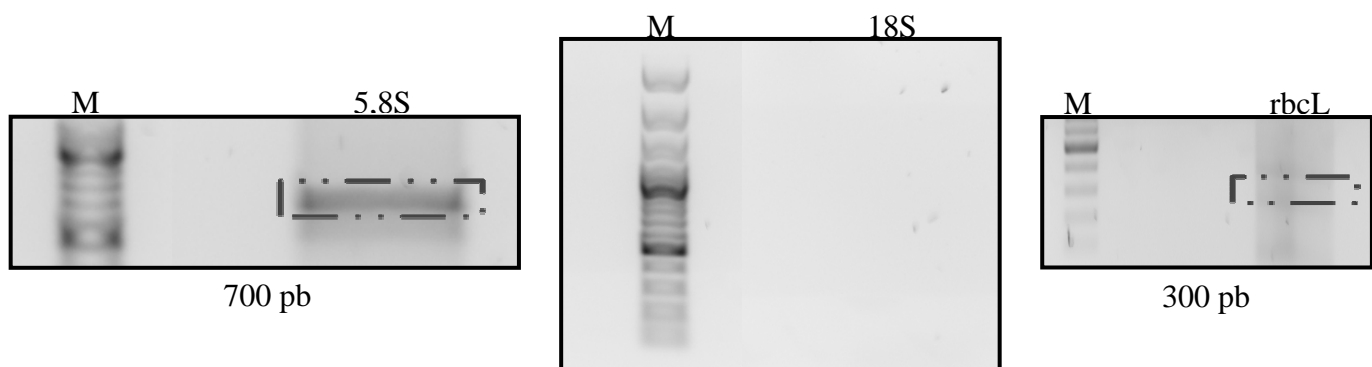


Figure 39. Produits de PCR amplifiés avec les amorces F18S/R18S du gène 18S, FITS1/RITS2 du gène 5,8 et FrbcL1/RrbcL7 du gène rbcL chez *Dunaliella salina*. Abréviations : M, marqueur de taille; pb, paire de bases; 18S, gène 18S amplifié à partir des amorces désignées sur l'alignement de séquences de 7 espèces du genre *Haslea* spp.; 5,8S, gène amplifié avec des amorces désignées sur la séquence du gène 5,8 de *Pseudo-nitzschia multistriata*; rbcL, gène rbcL amplifié à partir des amorces désignées sur la séquence du gène rbcL des diatomées *Sellaphora* spp.

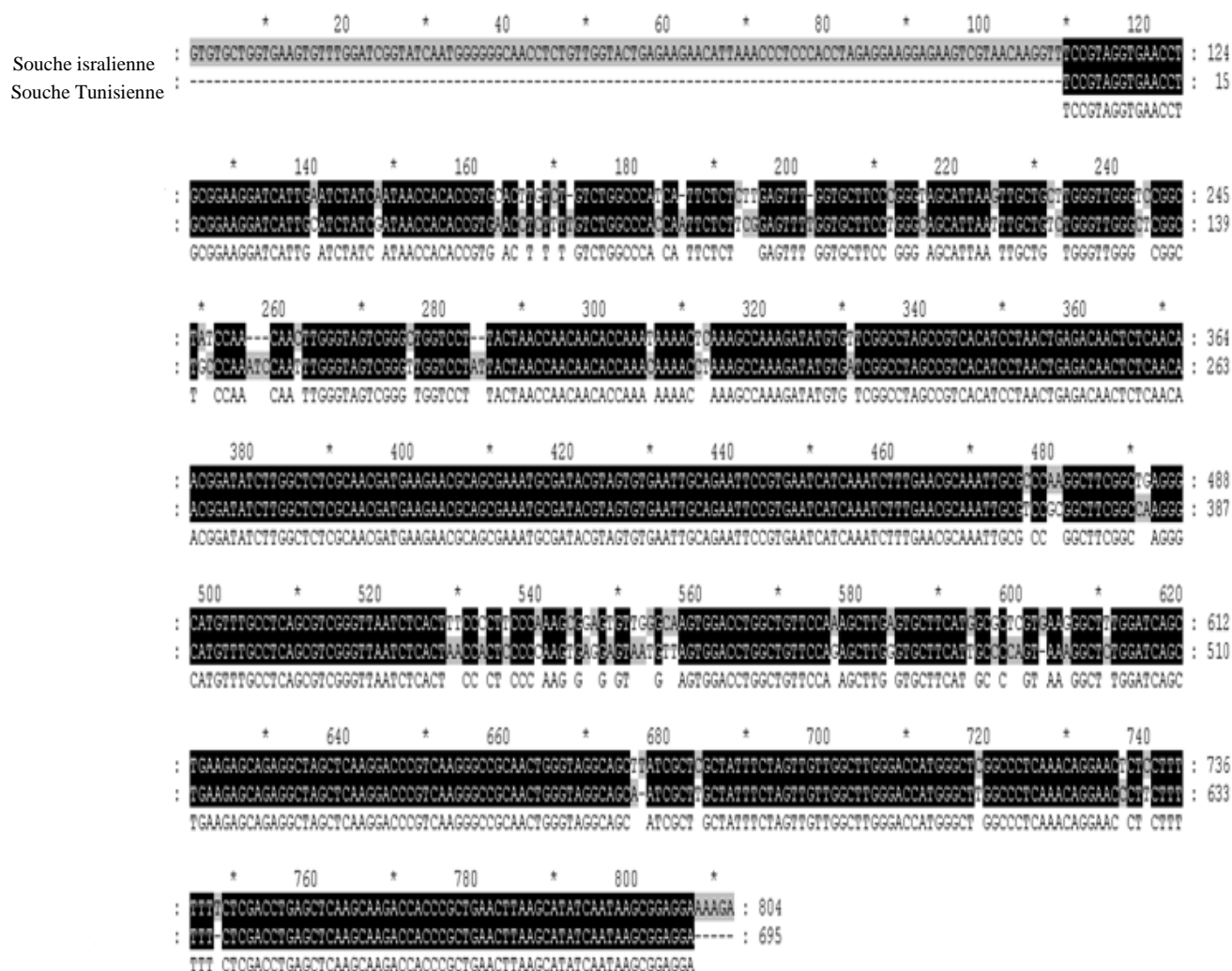


Figure 40. Alignement ClustalW des séquences de la banque de données NCBI de *D. salina* (souche israélienne : DQ116743.1) et de la séquence obtenue chez *Dunaliella salina* (souche Tunisienne, n° d'accès en cours d'obtention) cultivée au laboratoire. Les * représentent 100 % d'identité entre les séquences pour le gène 8.5S.

Cylindrotheca closterium

Le fragment amplifié de taille égale à 1300 pb correspond presque à la taille attendue qui est de l'ordre de 1400 pb concernant le gène 18S (Fig. 41). Après séquençage et vérification par blast à partir des banques de données (NCBI), la séquence correspond au 18S de *C. closterium* avec 100 % de similitude. Le numéro d'accèsion est DQ178314.1. L'alignement (Fig. 42) montre une conservation de 100 % pour ce fragment.

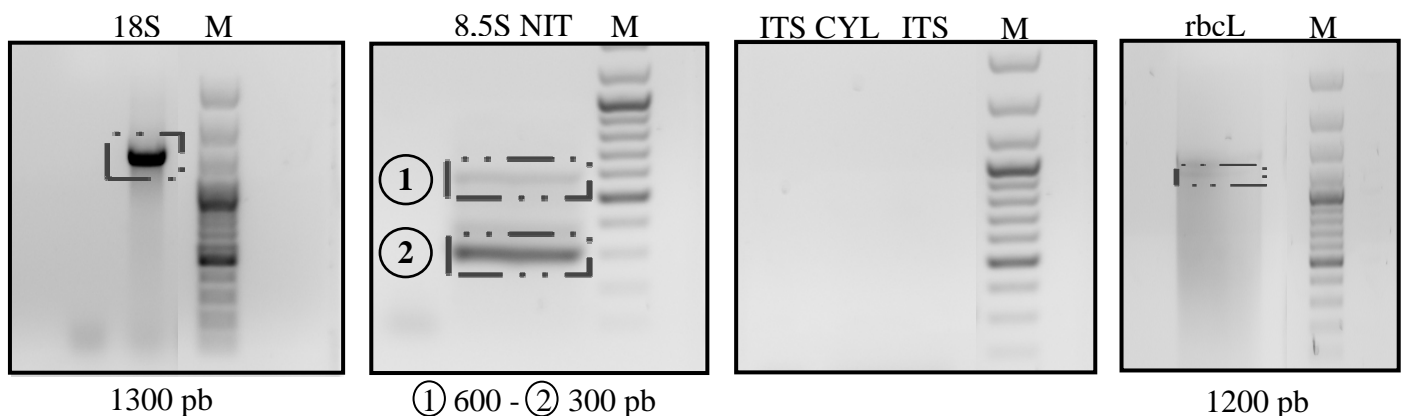


Figure 41. Produits PCR amplifiés par les amorces F18S/R18S, FNitITS2/ RNitITS2, FITS1/ RITS2, FcylindroITS2/ RcyllindroITS2 et FrbcL1/RrbcL7 chez *Cylindrotheca closterium*.

Abréviation : M, marqueur de taille; pb, paire de bases; 18S, gène 18S amplifié à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences gène 18S chez *Haslea* spp.; ITS_{NIT}, gène amplifiée à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences du gène ITS chez *Nitzschia* spp.; ITS_{CYL}, gène amplifiée à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences du gène ITS chez *Cylindrotheca* spp.; ITS, gène amplifié à partir des amorces désignées sur un alignement de séquences du gène ITS chez *Pseudo-nitzschia multistriata*, gène rbcL amplifié à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences chez *Sellaphora* spp.

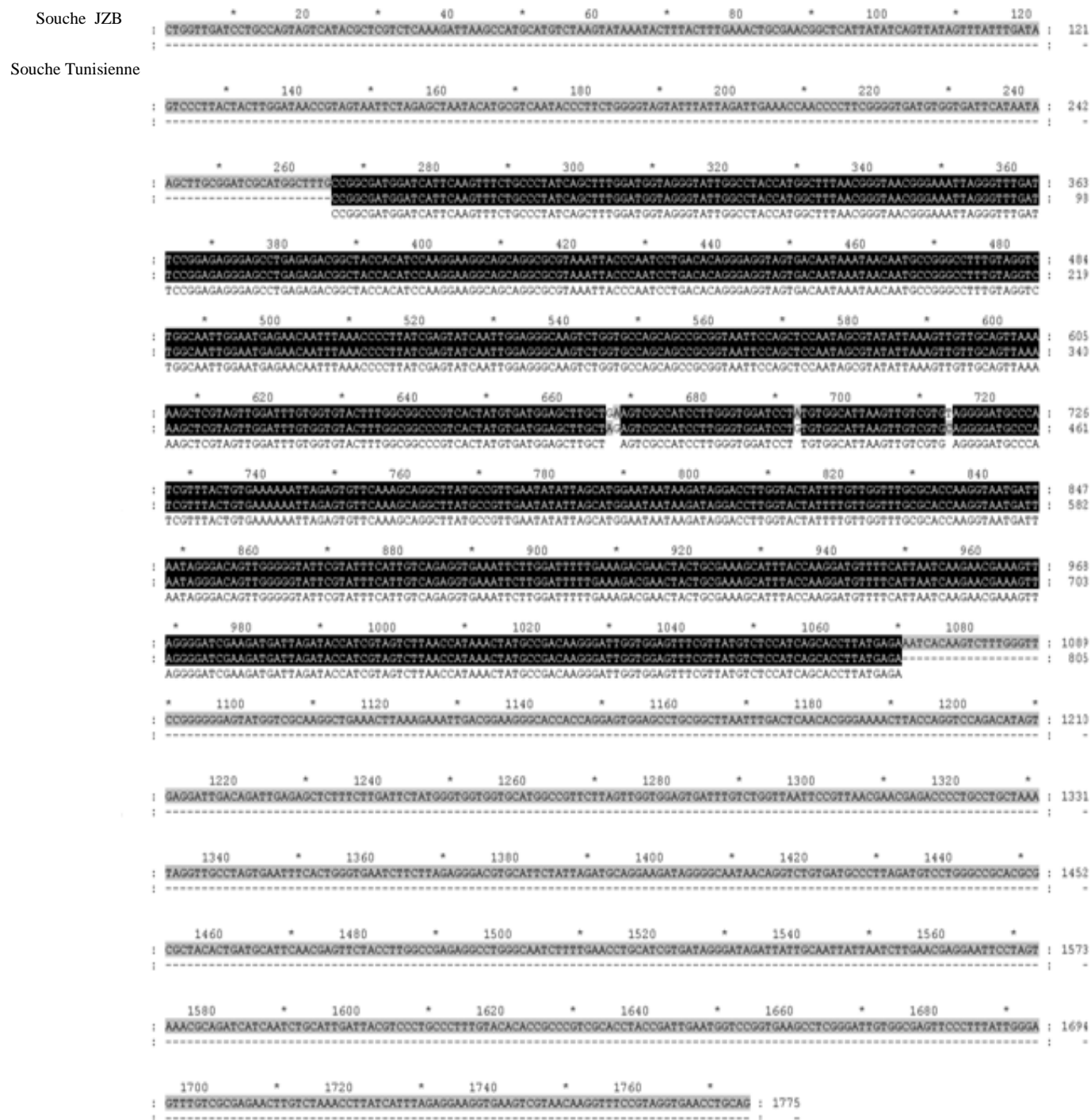


Figure 42. Alignement ClustalW des séquences de la banque de données NCBI *Cylindrotheca closterium* (DQ178314.1.) et de la séquence obtenue chez *Cylindrotheca closterium* (souche Tunisienne, N° d'accession en cour d'obtention) cultivée au laboratoire, Les * représentent 100 % d'identité entre les séquences pour le gène 18S

En ce qui concerne le gène 8,5, le produit d'amplifications PCR avec le couple d'amorces FNitITS2/ RNitITS2 révèle des amplifications à la taille attendue d'environ 300 bp et une autre de taille plus importante soit 600 pb (Fig. 43). Après séquençage, que ce soit le fragment à la taille attendue ou non, les deux amorces FNitITS2/ RNitITS2 ont été retrouvées de part et d'autre du fragment. Après séquençage et consultation des banques de données les fragments ne correspondent pas au gène 8,5S. De plus, l'alignement des deux fragments (600 et 300 pb) avec le fragment ITS2 de *Nitzschia* sp. montre qu'il y n'a une similitude qu'au niveau des amorces (Fig. 43).

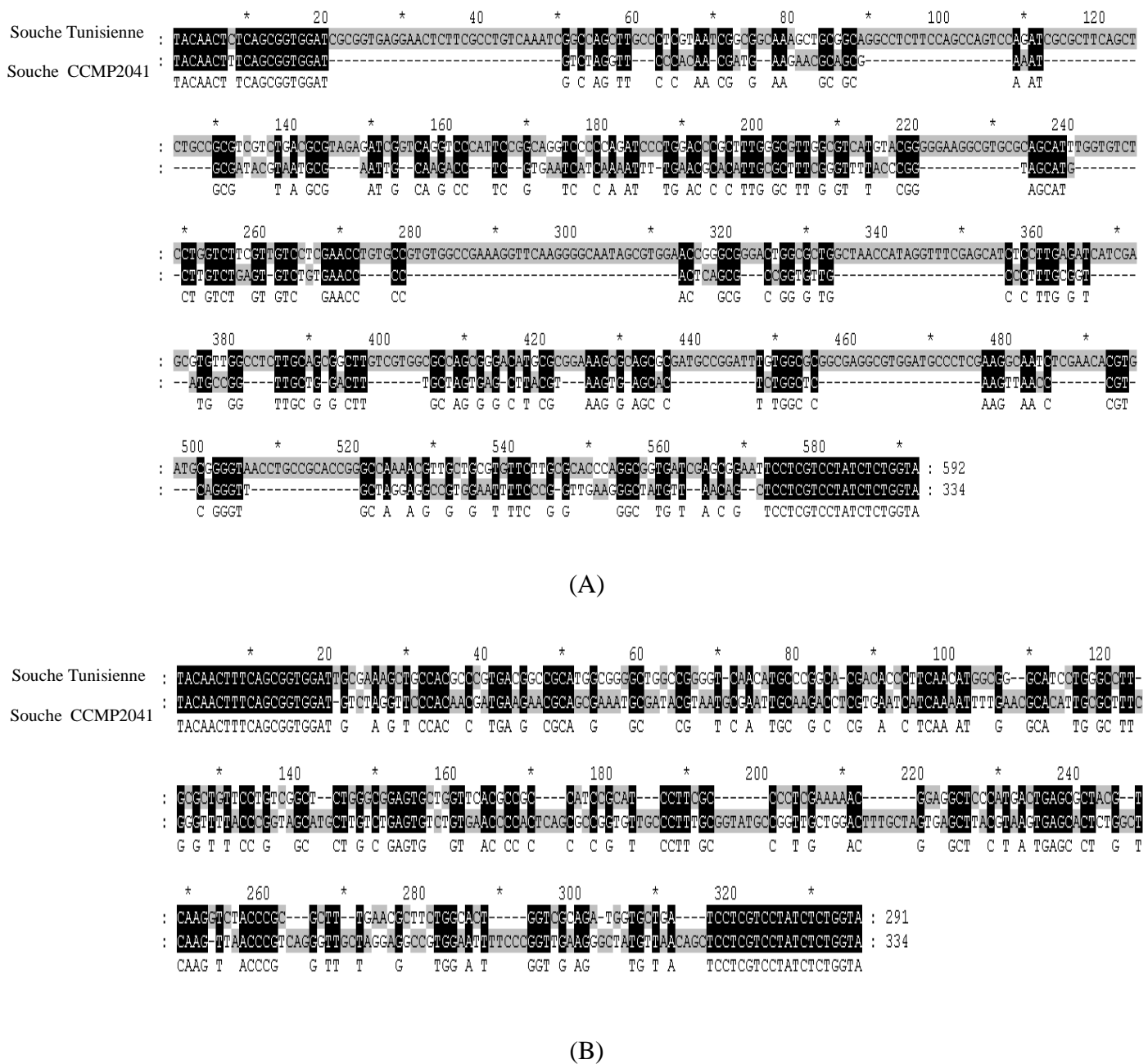


Figure 43. Alignement ClustaW des séquences ITS de la banque de données NCBI *Nitzschia* sp. (GQ330363.1) et de la séquence obtenue (A : 600 pb, B : 300 pb) chez *Cylindrotheca closterium* (souche Tunisienne) cultivée au laboratoire

Concernant le gène *rbcL*, le fragment amplifié de taille 1200 pb correspond presque à la taille attendue (1400 pb). Après une PCR sur colonies, le gène n'a pas été visualisé, ce qui veut dire que l'insert n'est pas complètement introduit.

Phormidium versicolor

Le gène 16S est le gène amplifié pour déterminer la cyanobactérie. Des amplifications de 600 pb, visualisées sur le gel d'agarose, correspondent environ à la taille attendue avec des amorces internes NFph16S/NRph16S et externes Fph16S/Rph16S (Fig. 44). Après séquençage, la comparaison de ces amplifications avec les séquences enregistrées dans les banques de données s'avère fructueuse. Les amorces sont systématiquement retrouvées de part et d'autre de la séquence et l'alignement ClustalW des séquences montrent 100 % d'identité avec une séquence 16S de *Phormidium* sp. (AM398796.1) (Fig. 45). Il est à noter que l'espèce n'est pas disponible dans la banque de données, ce qui nous permettrait d'enregistrer cette séquence pour la première fois avec une identification de la cyanobactérie comme étant *P. versicolor* (N° d'accèsion NCC466 : *Phormidium versicolor*/Wartmann in Rabenhorst 1861 ex Gomont 1892).

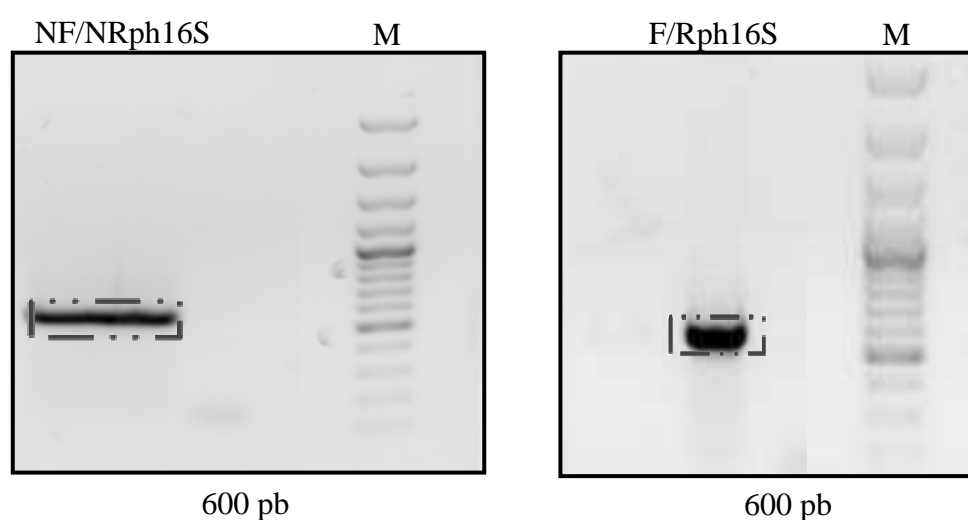


Figure 44. Produits amplifiés par PCR du gène 16S avec les amorces externes F/Rph16S et internes NF/NRph16S chez *Phormidium versicolor*. Abréviations : pb, paire de bases; M, marqueur de taille; 16S, gène amplifié à partir d'amorces désignées sur un alignement de séquences de ce gène chez 7 espèces de *Phormidium*.

Souche OL S6
Souche Tunisienne

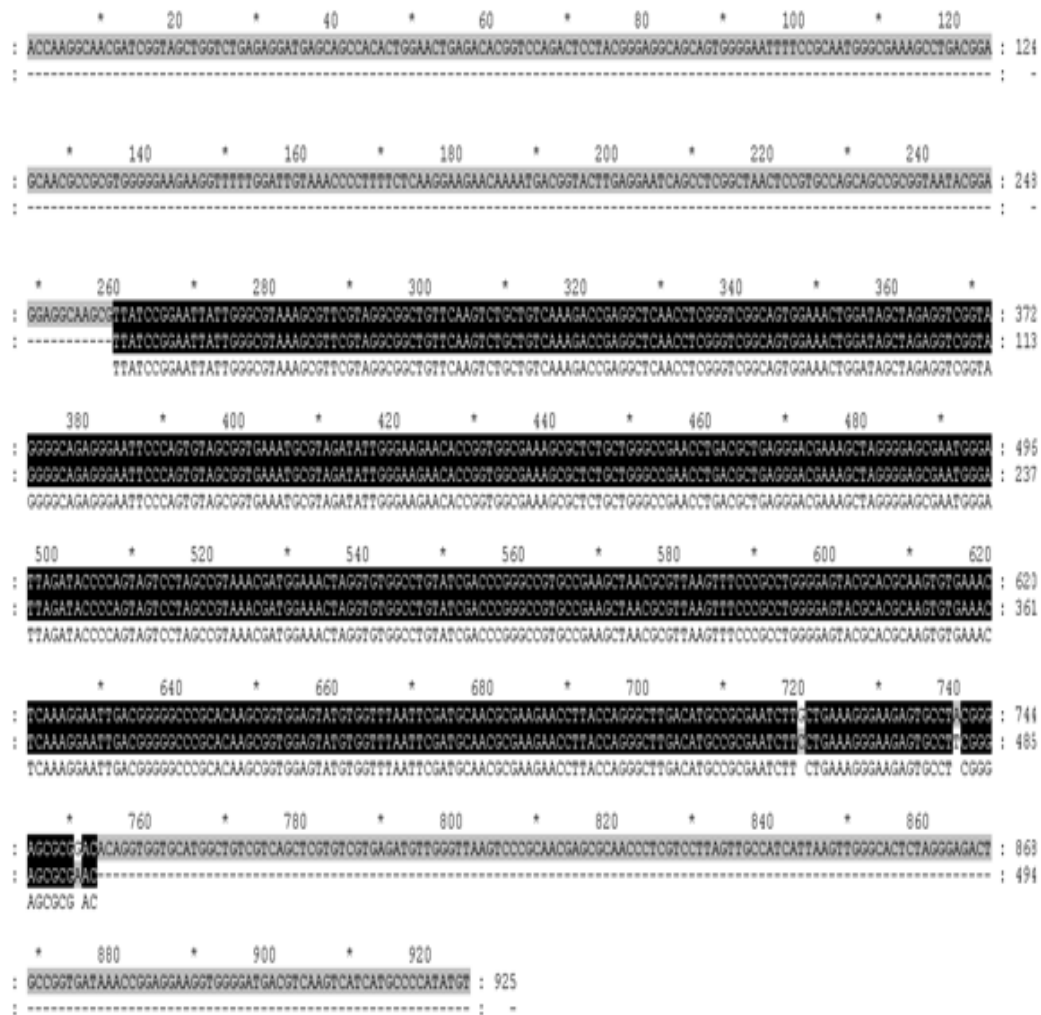


Figure 45. Alignement ClustaW des séquences 16S de la banque de données NCBI *Phormidium* sp. (AM398802.1) et de la séquence obtenue 600 pb chez *Phormidium versicolor* (souche Tunisienne, N° : NCC466 *Phormidium versicolor*/Wartmann in Rabenhorst 1861 ex Gomont 1892) cultivée au laboratoire

3. Discussion

Les algues constituent un ensemble d'organismes unicellulaires ou pluricellulaires, généralement décrits comme organismes photo-autotrophes, qui inclut également les cyanobactéries, ou les procaryotes phototrophes oxygénés. Leur identification est basée sur la morphologie (Siegesmund et al., 2008), la composition des pigments, les constituants biochimiques, le cycle de vie, le mode de reproduction et l'ultra structure cellulaire et son organisation (Borowitzka et Siva, 2007). Lopes et al., (2012) mettent l'accent sur des résultats morphologiques et phylogénétiques des espèces de cyanobactéries et confirment qu'il est

particulièrement difficile de différencier les espèces en se basant seulement sur la morphologie, vue la plasticité des caractères morphologiques en fonction de l'habitat (Neilan et al. 1995). En effet, l'identification et la classification des organismes basées sur les régions conservées et variables des espaceurs ITS (Premanandh et al. 2006), 16S ou 18S, est une procédure courante dans les études de taxonomie (Hejazi et al., 2010). Néanmoins, les bases de données présentent un nombre limité de séquences disponibles pour certains taxons, ce qui rend l'identification systématique difficile. Ceci justifie, la nécessité de combiner les deux outils pour avoir une identification satisfaisante.

Dans cette étude, trois espèces phytoplanctoniques, deux micro-algues et une cyanobactérie ont été isolés et caractérisés à partir de la saline de Sfax. L'identification s'est basée essentiellement sur des critères morphologiques (la taille, frustule, pigments...; Tomas et al., 1996; Borowitzka et Siva, 2007) et moléculaires (le gène 16S, 18S...) (Hasler et al., 2012; Siegesmund et al., 2008; Premanandh et al., 2006; Casamatta et al., 2005; Taton et al., 2003; Boyer et al., 2002). Lopes et al. (2012), s'est basé également, sur des caractéristiques morphologiques (forme des cellules, tailles des cellules, présence / absence de gaine) et moléculaires (le gène 16S) pour isoler et identifier 44 espèces de cyanobactéries à partir d'un estuaire portugais. 30 souches de *Phormidium*, collectées dans des régions et habitats différents, ont été caractérisées en utilisant une approche polyphasique, en comparant les caractéristiques phénotypiques (morphologie des cellules et des filaments) et moléculaires (gène 16S, espaceurs ITS) (Palinska et Marquardt, 2008; Marquardt et Palinska, 2007). Dorador et al. (2008), ont étudié la diversité des cyanobactéries dans la saline du Chili via les produits de PCR du gène 16S. Notre cyanobactérie a été identifiée via le gène 16S, puisque ce marqueur ribosomique est couramment utilisé pour identifier les procaryotes, qui est disponible en grand nombre de copies dans le génome et présente des régions hautement conservées (Alverson, 2008). Le gène 18S a été utilisé pour l'identification des différents micro-organismes eucaryotiques comme *Dunaliella* (Mishra et al., 2008; Raja et al., 2007; Olmos et al., 2000). En effet, selon Olmos (2009), l'utilisation du gène 18S comme "empreintes digitales" a permis de signaler les espèces hyper productrices de β -carotène chez *Dunaliella*. Les espaceurs ITS sont fréquemment utilisés pour la discrimination de la variation génétique des algues vertes (Gomez et Gonzalez, 2001). La comparaison des séquences de la région ITS a été utilisée pour prédire la parenté génétique, la phylogénie et la taxonomie du genre *Dunaliella* (Gomez et Gonzalez, 2004). La région ITS2 a été utilisée pour l'analyse phylogénétique et taxonomiques des micro-algues, spécifiquement *Dunaliella* (Assuncao et

al., 2012). Hejazi et al. (2010), ont pu différencier les espèces *D. salina*, *D. bardawil*, *D. viridis* et *D. tertiolecta* via les espaceurs ITS et gènes 18S. Dans notre étude, nous nous sommes basés sur ce gène et ces espaceurs afin d'identifier *D. salina* récoltée de la saline de Sfax.

Les travaux menés sur la phylogénie et la taxonomie des diatomées étaient basés exclusivement sur les caractéristiques morphologiques comme les frustules de silice et sur les caractéristiques structurelles des cellules vivantes (Beszteri et al., 2001) comme les pigments (Premanandh et al., 2006). Les études phylogénétiques, basées sur la biologie moléculaire, commencent à se développer à la fin des années quatre vingt dix grâce à Medlin et ses collaborateurs (Medlin et al., 1991, 1995, 1996, 1997, 1999). Afin d'évaluer la monophylie et la phylogénie des Naviculaceae (*Amphora montana*, *Gomphonema parvulum*, *Eolimna minima* (syn, *Navicula minima*), *Eolimna subminuscula* (syn, *Navicula subminuscula*), *Navicula veneta* et *Phaeodactylum tricornutum*), Beszteri et al. (2001) se sont basés sur les séquences du gène 18S. Ce gène est un marqueur stable qui évolue indépendamment de la morphologie (Bahtachayra et al., 1992; Woese, 1987). Selon Alverson. (2008), chaque marqueur peut résoudre un niveau différent des relations phylogénétiques. Par exemple, la petite sous-unité (SSU) du gène 18S est utile pour reconstruire des relations de niveau supérieur dans la phylogénie des diatomées (Alverson, 2006); alors que la grande sous-unité (LSU) ou 28S et les régions ITS1 et 2, peuvent résoudre des relations au niveau des espèces et parfois des populations (Vanormelingen et al., 2007, 2008; Beszteri et al., 2005; Godhe et al., 2006; Behnke et al., 2004; Boyer et al., 2002) spécialement chez les diatomées comme *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Orsini et al., 2004). Dans notre cas, nous avons eu recours aux espaceurs ITS pour trancher l'ambiguïté portée sur le genre de diatomée, pour savoir s'il s'agit de *Nitzschia longissima* ou de *Cylindrotheca closterium*. L'amplification du gène 5,8S confirme qu'il s'agit bien de *Cylindrotheca closterium*. L'étude phylogénétique des diatomées est basée essentiellement sur le gène *rbcL* (Daugbjerg et Guillou, 2001). L'amplification positive des gènes 18S et *rbcL* est une confirmation de l'identification de cette espèce.

Chapitre III : Etude moléculaire des trois espèces phytoplanctoniques

Recherche du gène SOS1

Des amorces ont été définies sur des alignements de séquences du gène SOS1 de la macro-algue *Ectocarpus siliculosus* avec un antiport Na^+/H^+ de la microalgue *Ostreococcus lucimarinus* (Prymnésiophycée). A partir de ces alignements, une recherche du gène SOS1 a été effectuée en premier lieu sur l'ADNg de la Chlorophycée *D. salina* (Tableau 6).

Pour le gène SOS1, les amplifications PCR faites avec les amorces NOS1F1/ROS1R1 montrent une hybridation de l'amorce sens NOS1F1 sur les deux brins d'ADNg. Nous faisons la même constatation pour le couple d'amorces OS1F2/ROS1R2 et OS1F2/ROS1R2 qui ont permis des amplifications de 600, 900 et 800 pb à partir de l'hybridation de l'amorce anti-sens R2 sur les deux brins d'ADNg (Fig. 46, 47).

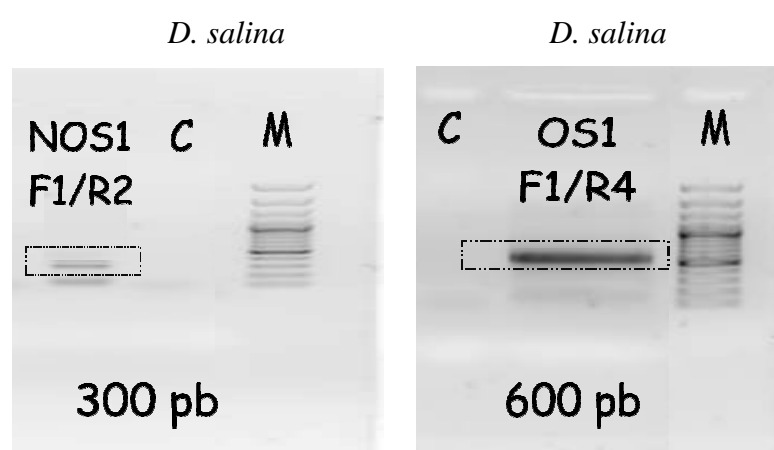


Figure 46. Produits d'amplification par PCR de l'ADNg de *D. salina* à partir de l'ADNg de *D. salina* et les amorces NOS1F1/ ROS1R1 (à gauche) et OS1F1/ OS1R4 (à droite). Abréviations : pb, paire de bases; C: contrôle; M: marqueur de taille.

ROS1R2

CACGACGAGCGCGAGGTACATGTATGGGTGTGTGTGCATGTGCATATGTGTGTGC
 TTGCGTGAGCCACAGTAAGCACCCCTGTCACTCACAAAACACACACGCACGCATGT
 GCACACAGGTGTACGTCATCACCAAGCTGGGCCTGCTGTTTGTGTATGACCTGGA
 GACAGCCACAGCAGTGTATCGCAACCGCATCAGCCCAGACCCCATTTTCCTGGCC
 ACCACCTCCGCATCCACGGGCGGCTTCATCGCTGTGAACAGGTGGGTGTGTACAT
 ATCATATGTACATATGTAATGTGTATGTACGTATTGTATGTAAGTGTCTTCGCAAA
 CACGTAATGGGGCTTCTTCCTGCCACCACCACATCCACACGCGGCTTCATCGTTGT
 GAACAGGTTCGGTGCTGCCTGCACAAGTAGCAAACATGTCTCAGGTACAGGCACCT
 GTGAGTACAGTGGCAATCTCACAGCGCACGCAAGCATTGCTGACGTGTTACTATC
 CACAATGGACTGTGCAGACTGCAGGTGCAGCTCAACACATGCTATTCTCTCACTT
 TGTGTCTGTCCACTTGCACTGCCGACGCGTTATATTTTCCATGACACTGCGTGAAT
 AATTGCGGGCGCGGCCAAGTGCTGCTCGGTACCGTGAATGAGGCCACCATGGTGC
 CTTTTGTGAGCACGCAGCTTGCCAACCTAGGA**CTGGCGCTCGTCGTG**

ROS1R2

Figure 47. Exemple de séquence amplifiée de 600 pb montrant la présence de l'amorce ROS1R2 s'hybridant de part et d'autre de la séquence obtenue avec l'ADNg de *Dunaliella salina*

Nous avons obtenu un fragment de 300 pb avec le couple d'amorces NOS1F1/ROS1R2. Ce fragment a été séquencé. Les résultats de séquençage révèlent la présence des deux amorces de part et d'autre de la séquence mais celle-ci ne présente pas d'identité avec les séquences de SOS1 disponibles dans les banques de données. Nous avons obtenu un résultat similaire avec le couple d'amorces OS1F1/ROS1R4 ayant amplifié un fragment de 600 pb (Fig. 48).

OS1F1

GCTACCGATCCCGTCGC GCCAAACGAACGAGATTAACGAGTTACTTTATATGCGA
AACGAATGCTTTATGCGCTTTGAGCGCCTGGCCGACGATGGCCGTGCGCGCCGTG
GCCGCCTCCACTTCCCCCGTGGCACAGTGGAGACCCCGGCGTTTATGCCAGTAGG
CACCTACGGCACGGTGAAAGGCATGACGCCGGATTCCGTCAAAGAGATCGGCGC
CGAAATCATCCTCGGCAACACCTTTCACCTGTGGCTGCGCCCTGGCACCGAGGTG
ATTGAAGCTCACGGCGACCTGCATGACTTCGCCCAGTGGGACAAACCGATTCTGA
CCGACTCCGGCGGTTTTTCAGGTCTTCTCCCTGGGCGAAACGCGCAAAATCACCGA
GCAGGGCGTGCACTTCCGCTCGCCGGTGGATGGCAGCAAAGTCTTTATGGGCCCCG
GAAGAGTCCATGGCGGTTTCAGCGTTCGCTGGGCTCCGATGTGGTGATGATCTTTG
ACGAGTGTACGCCCTACCCGGCCACCTTTGACGAAGCTGAGAAATCCATGGAGCT
GTCGCTGCGCTGGGCCAAACGCTCGCGTGATGCCACGGCGACTCCCCTTCCGCG
CTGTTTGGTATTATTCAAGGCGGCATGCACCCTGAGCTGCGCGAACGCTCACTCA
GAGGGCTGCTGGAAATCGGCTTTGATGGTTGACGATTGGCGTTCTTGGCGTCGTG
G

ROS1R4

Figure 48. Exemple de séquence obtenue avec le couple d'amorces OS1F1/ROS1R4 qui s'hybride correctement de part et d'autre de la séquence ayant une taille de 600 pb obtenue à partir de l'ADNg de *Dunaliella salina*

Tableau 6. Récapitulatifs des différentes PCR réalisées afin de détecter l'antiport SOS1 chez *Dunaliella salina*, (+) : amplification de séquences

	OS1F1	OS1F2	OS1F3	NOS1F1
OS1R1				+
OS1R2		+		+
OS1R3		+		
OS1R4	+			
OS1R5				

D'autres amorces ont été définies sur des alignements de séquences du gène SOS1 de la plante aquatique *Cymodocea nodosa*, et d'un antiport Na^+/H^+ d'*Ostreococcus lucimarinus*. La recherche du gène SOS1 a été effectuée sur l'ADNg de *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor*.

Une amplification PCR avec les amorces FCYMO1/RCYMO1 a donné deux fragments de 500 et 600 pb, Après séquençage, nous avons constaté que seule l'amorce sens FCYMO1 s'est fixée de part et d'autre de la séquence d'ADNg amplifiée de *P. versicolor* (Fig. 49) et *C. closterium* (Fig. 50) respectivement.

FCYMO1

ATCCCGTCGCTGTTGTGCTACAGTTGGACCGACCACATTGACGAAAATAACCA
GTTTTTCAGAGCTGGCCCCACCTCACCTTTTCCGGTGATGTCTATAAACGGCTCA
TCATCAGTGATTTTGTCTGGTAGTGGGTCCAATGTTCTGATTTCGTAAGTCTGCCTTT
GAAGCCGTAGGTGGATTTGCCCCAGTCTCACCCCAGCCGAAGATTGGGATTTAT
GGGTCCGATTGGCGGCCAACGATGAGTTTGTCTGGTTCCCAAGTGCAAATTCTC
TATCGAACCGTCACCTCGTCCTCATCCTTTAATTTAGCCAAGATGGAGGCATCCA
GCTTACAGGTCATCGAACGTATTTTTGCCGCCGCTCCCCCGAGTTACAGCACCTC
TCGCGGATTTGTCTCGGTCATCGCTATAAGTATTTAACCTATAAAGCCTTAGATTT
AACCCGAGAACGACGACGGGCCAGAGCAGCCTTTCGCTTTTTCGCTTTGGCCCTC
AGGGATGACCCGAGTCTGTGGCGACGACAGCGACGGGAT

FCYMO1

Figure 49. Exemple de séquence obtenue avec le couple d'amorces FCYMO1/RCYMO1, dont seule l'amorce sens s'est hybridée de part et d'autre de la séquence de 500 pb, chez *Phormidium versicolor*

F CYMO1

ATCCTGTCGCCGTTGTTGCCAATCAAATGTGTCATTGCAGCTGTTGTCTGTGCAAT
 ACTCTCTCCCTCTCTCTCTCGTATCTTCCTCCACAACACACACAAATCCTTGGTAG
 TACCAGGATTGGATGACAATGATGAACAGCAAGTTGATTATAAAACTATTTCAGCG
 TATCATCGCTCCTACTTGCCTTTTCATGAGGATGGTCATTGTTCGTTTCTTCGCTTCGG
 CATTGCCAGAGGATTTTGATGACAAACAAGTCAAGTCCATCAGTTTGTGACCGA
 TTTTGCGTTCTTGCCGGATGGTCAAATGTTGATTAGCGAAAAGAATGGCAAGATT
 CATGTAATGGAAGATCCCTTGTCTCTCAACAGTGGTGTTCGGACGCTCTTGAACCTT
 GGAAAGCTTCATTTGCAACAACGGAGAACGTGGTGTCAACAGCCTGCTGGTGGAT
 CCCGACTTTGATGCGAATCGATACGTCTATGTCTATTACACCTGGAACAAGAACA
 ATTTTGTGGTACCGACTCGGATCAAGCTCCCGTCAACCGCTTGTTCGCGATTCAAA
 CTTGCCGACGATTTGAGCTTCGGATCCGAAGAGCATCTGGTACAGACCGATCCCG
 TCGTCAAGCAATATCACAATGCCGGTGGGATCGTGTGG**GGCGACGACAGCAACG**
GGAT

F CYMO1

Figure 50. Exemple de séquence obtenue avec le couple d'amorces FCYMO1/RCYMO1, dont seule l'amorce sens s'est hybridée de part et d'autre de la séquence de 600 pb chez *Cylindrotheca closterium*

L'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification par PCR avec le couple d'amorces FCYMO1/RCYMO1 révèle des amplifications de l'ordre de 300 bp. Après séquençage et malgré le fait que le couple d'amorces se soit fixé correctement sur l'ADNg de *C. closterium* (Fig. 51), aucune homologie avec le gène SOS1 disponible dans les banques de données n'a été révélée.

FCYMO2

AGGGGAGTCGCTTGTGAATGA AAGCTGGGCGCTGGAGCAGGTCTTTTCGGCCAGT
 TCGCGCGCGGCTCCGCTGGAACATCGAGAGAACGCGCCGTACCTGGCGCAGATC
 GTCGATGGCCGCGTGGTGGTGCATGATTACGGCGTGCAGGGCGCGGATGGTGTCT
 GGTCTCTGGCGAGCGGCGCGGATGTGCTGGCGCAGGACGGCAGCGTCATCGCCG
 CGCCGACGGTCGCGGATATCCTTGCGCAGGGTGCTGCCGAGG GGCTTGAGTGGCG
 CTGTGG

RCYMO1

Figure 51. Exemple de séquence amplifiée avec le couple d'amorces FCYMO2/RCYMO1 qui s'hybride correctement de part et d'autre de la séquence de 300 pb chez *Cylindrotheca closterium*

2. Discussion

Les antiports Na^+/H^+ situés au niveau de la membrane plasmique sont un système d'expulsion du sodium ubiquiste. Il pourrait résulter d'une série d'épisodes évolutifs qui se sont succédés et ont généré la famille des NHE dans le règne animal et la famille des CPA1 chez les plantes et les champignons. Cette dernière comprend les antiports NHX et SOS jouant un rôle équivalent dans l'homéostasie cellulaire (Brett et al., 2005). Selon ces auteurs, chez les plantes et les champignons, les H^+ -ATPases génèrent une force protonomotrice au niveau de la membrane plasmique acidifiant ainsi le périplasme et permettant l'expulsion du sodium du cytosol. Les microalgues et les cyanobactéries sont dotées d'antiports cation / proton appartenant à la famille CAP1 qui assurent l'équilibre ionique et l'homéostasie (Chanroj et al., 2012; Brett et al., 2005; Saier, 2000). Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'antiport SOS1. Dans la littérature, cet antiport a été signalé chez la macroalgue brune *Ectocarpus siliculosus* et la plante terrestre *Arabidopsis thaliana* (Zhu, 2000). Aucune donnée sur sa présence chez les microalgues n'a, à notre connaissance, été rapportée. Plusieurs gènes NhaP chez les procaryotes et les archées sont situés à la base de la branche des CPA1 (Fig. 15), ce qui laisse suggérer que le gène ancestral NhaP aurait donné lieu aux gènes CPA1 chez les eucaryotes (Chanroj et al., 2012). Ces auteurs montrent que le gène ancestral NhaP a divergé et évolué pour donner deux types distincts : NHX (y compris SOS) et NhaP. Brett et al. (2005) ont montré également qu'il existe des relations phylogénétiques entre le gène SOS1 chez les plantes et les gènes NhaP bactériens codant des antiports Na^+ / H^+ . Il a été aussi montré que le rôle majeur des antiports SOS1 chez les plantes est similaire à celui des

antiports NhaP chez les cyanobactéries et les microalgues : l'extrusion du Na^+ qui permet une tolérance au stress salin (Chanroj et al., 2012). Hamada et al. (2001) ont mis en évidence une homologie structurelle entre SOS1 identifié chez *Arabidopsis* et l'antiport identifié chez *Synechocystis* sp. PCC 6803. Ce dernier possède également une similitude structurelle avec le transporteur NhaP identifié chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Les gènes CPA1 sont présents chez les procaryotes et les eucaryotes, les antiports NhaP et SOS1 régulent le flux des cations/ H^+ au niveau de la membrane plasmique, que se soit chez les microalgues, les cyanobactéries ou les plantes terrestres. Les NHX vacuolaires seraient apparus plus tardivement au niveau des compartiments intracellulaires chez les eucaryotes : vacuoles chez les microalgues et les plantes. Chanroj et al. (2012) suggèrent que la famille des gènes NHX a évolué pour répondre aux besoins fondamentaux de l'homéostasie du pH et des cations dans les cellules eucaryotes.

Nos résultats infructueux nous laissent supposer que les antiports SOS1 sont inexistantes chez les microalgues et la cyanobactérie récoltées de la saline de Sfax. En effet, une étude similaire, à partir d'amorces issues d'un alignement de séquences de plantes terrestres, a été également infructueuse (Hamza, 2010). L'antiport SOS1 et la protéine kinase SOS2 ont été signalés chez la macroalgue *Ectocarpus siliculosus* (Banque de données) qui est proche phylogénétiquement des diatomées.

Plusieurs travaux mettent en évidence la présence d'antiports Na^+/H^+ différents de SOS1. Par exemple, la cyanobactérie *Aphanothece halophytica* possède un antiport Na^+/H^+ protéique qui assure à la fois l'équilibre ionique et maintient le pH cellulaire constant (Bualuang et al., 2010). Lorsque les cellules cultivées sont exposées à une forte salinité pendant 15 jours, l'activité de l'antiport Na^+/H^+ est plus importante que chez les cellules cultivées à une faible salinité (Bualuang et al., 2010). Les auteurs ont suggéré que l'antiport Na^+/H^+ possédait un rôle crucial pour la tolérance au sel chez *A. halophytica*. Les travaux de Waditee et al. (2001) et Wutipraditkul et al. (2005) montrent que *A. halophytica* possède des antiports Na^+/H^+ de type NhaP et NapA. Wiangnon et al. (2007) ont montré l'existence d'une ATPase de type P stimulée par Na^+ chez *A. halophytica*. L'étude de Bualuang et al. (2010) montre que l'activité d'échange signalée chez *A. halophytica* est la contribution de divers antiports Na^+/H^+ dans les cellules, c'est à dire les NapA et NhaP. *A. halophytica* possède également un symport Na^+ -bétaine qui contribue à la tolérance au stress salin à pH alcalin (Laloknam et al., 2006). La cyanobactérie *Synechococcus* sp. PCC 7942 d'eau douce montre une surexpression du gène NhaP lorsqu'elle est cultivée dans l'eau de mer, rendant ainsi sa

croissance possible après l'introduction du gène ApNhaP codant l'antiport Na^+/H^+ d'*A. halophytica* (Waditee et al., 2002). Chez la cyanobactérie marine *Spirulina subsalsa*, la génération d'un gradient de protons par la cytochrome oxydase joue un rôle dans l'extrusion de Na^+ via l'antiport Na^+/H^+ . Gabbay-Azaria et al. (1992) signalent une activité accrue de la pompe H^+ -ATPase spécialisée dans l'extrusion du Na^+ impliquant une tolérance au stress salin. Chez *Synechocystis* sp, PCC 6803, l'antiport Na^+/H^+ assure des fonctions vitales comme la régulation du pH interne, du volume cellulaire et de la concentration en sodium dans le cytoplasme (Hamada et al., 2001). Une H^+ -ATPase a été identifiée dans la membrane plasmique de les microalgues marines *Heterosigma akashiwo* (Shono et al., 1996) et *Tetraselmis viridis* (Popova et al., 1999). Pick (1992) suggère l'existence d'une Na^+ -ATPase putative qui pourrait expulser les ions sodium à l'extérieur des cellules de *D. salina*. Katz et Pick (2001) confirment que l'extrusion du Na^+ chez *Dunaliella* est liée à un système redox NADPH au niveau de la membrane plasmique. Ehrenfeld et Cousin (1984) ont observé un échange rapide entre les ions sodium et potassium, suite à des chocs osmotiques. Ces auteurs suggèrent également l'existence d'un transporteur Na^+/K^+ actif chez *Dunaliella*. Bhattacharyya et Volcani (1980) ont montré la présence d'un transporteur de silicate Na^+ -dépendant chez la diatomée marine *Nitzschia alba*. Selon Sullivan (1976), *Navicula pelliculosa* possède aussi un transporteur transmembranaire actif de silicium Na^+ -dépendant.

Chapitre IV: Réponse physiologique des trois espèces phytoplanctoniques

1. Résultats

L'impact de trois concentrations en NaCl (40, 80 et 140 g L⁻¹) et de trois niveaux d'éclairement (300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a été mesuré au niveau de la croissance cellulaire, de l'activité photosynthétique et de l'activité enzymatique anti-oxydante chez les deux micro-algues et la cyanobactérie.

1.1. La croissance

La croissance de *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor* cultivés dans les neuf conditions expérimentales a été suivie pendant 6, 12 ou 13 jours selon le niveau d'éclairement et l'espèce. Les courbes de croissance des deux micro-algues ont été établies par dénombrement cellulaire et celle de la cyanobactérie, dont la numération était impossible, par dosage de la Chl_a. Les courbes de croissance sont présentées Figure 52 et les paramètres de croissance sont rapportés dans le Tableau 7.

Les courbes de croissance de *D. salina* cultivée en présence de NaCl 40 et 80 g L⁻¹ sont peu différentes, mais la densité cellulaire est augmentée avec le niveau d'éclairement. La croissance est plus faible en présence de 140 g L⁻¹ de NaCl. Cet effet s'accroît avec l'augmentation du niveau d'éclairement. La phase exponentielle de croissance est située entre J3-J5 sous le plus faible niveau d'éclairement aux trois salinités et elle se situe entre J3-J6 aux éclairagements E500 et E1000 respectivement et aux trois salinités.

Le taux de croissance spécifique et le temps de doublement ont été calculés pendant la phase exponentielle de croissance, entre J3-J4, J5-J6 et J4-J6 sous E 300, E 500 et E 1000 respectivement et aux trois salinités (Tableau 7). Le taux de croissance chez *D. salina* est affecté par le niveau d'éclairement. En effet, le taux de croissance spécifique est compris entre 0,30 j⁻¹ et 0,37 sous E 300 aux trois salinités, alors qu'il ne dépasse pas 0,16 j⁻¹ aux deux autres niveaux d'éclairement (Tableau 7). Le test ANOVA vérifie qu'il existe une différence hautement significative entre les éclairagements ($F = 16,86$; d.d.l = 18 ; $p < 0,001$; Tableau 8). Par ailleurs, le temps de doublement est aussi influencé par le niveau d'éclairement ($F = 16,86$; d.d.l = 18 ; $p < 0,001$) (Tableau 8).

Chez *C. closterium*, la croissance est très faible, voir nulle, en présence de 140 g L⁻¹ de NaCl (Fig. 52, Tableau 7), et rend impossible la détermination des phases et des paramètres de croissance. En présence de 40 g L⁻¹ de NaCl, la croissance est légèrement plus élevée qu'avec 80 g L⁻¹ sous E 300, alors qu'elle est quasiment absente avec 140 g L⁻¹ de NaCl sous les trois éclairagements. La croissance est stimulée par l'augmentation du niveau d'éclairement. La phase exponentielle de croissance est située entre J3 et J4 pour les trois salinités et à E 300 et entre les jours 5-6 et 3-5 pour les salinités 40 et 80 g L⁻¹ sous E 500 et E 1000 respectivement. Pendant la phase exponentielle de croissance, μ ainsi que le temps de doublement sont influencés par le NaCl ($p < 0,05$) et le niveau d'éclairement ($p < 0,01$) mais sans qu'il y ait une interaction entre ces deux variables ($p > 0,05$) (Tableau 8a). Nous pouvons remarquer que les densités maximales obtenues chez *C. closterium* sont nettement plus faibles que celles enregistrées avec *D. salina*.

Chez *P. versicolor*, la concentration en Chla au début de l'expérience est de 0,005 $\mu\text{g mL}^{-1}$ dans toutes les cultures. La plus forte croissance est enregistrée en présence de NaCl 80 g L⁻¹ et sous E 300, la plus faible en présence de NaCl 140 g L⁻¹ et le plus fort éclairage. Sous E 500, la croissance de *P. versicolor* est plus élevée en présence de 40 g L⁻¹ de NaCl, les courbes de croissance en présence de 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sont presque confondues. Le NaCl et la lumière perturbent significativement la croissance de cette espèce (Fig. 52), tant au

niveau du taux de croissance spécifique ($p < 0,01$) que du temps de doublement ($p < 0,001$) (Tableau8).

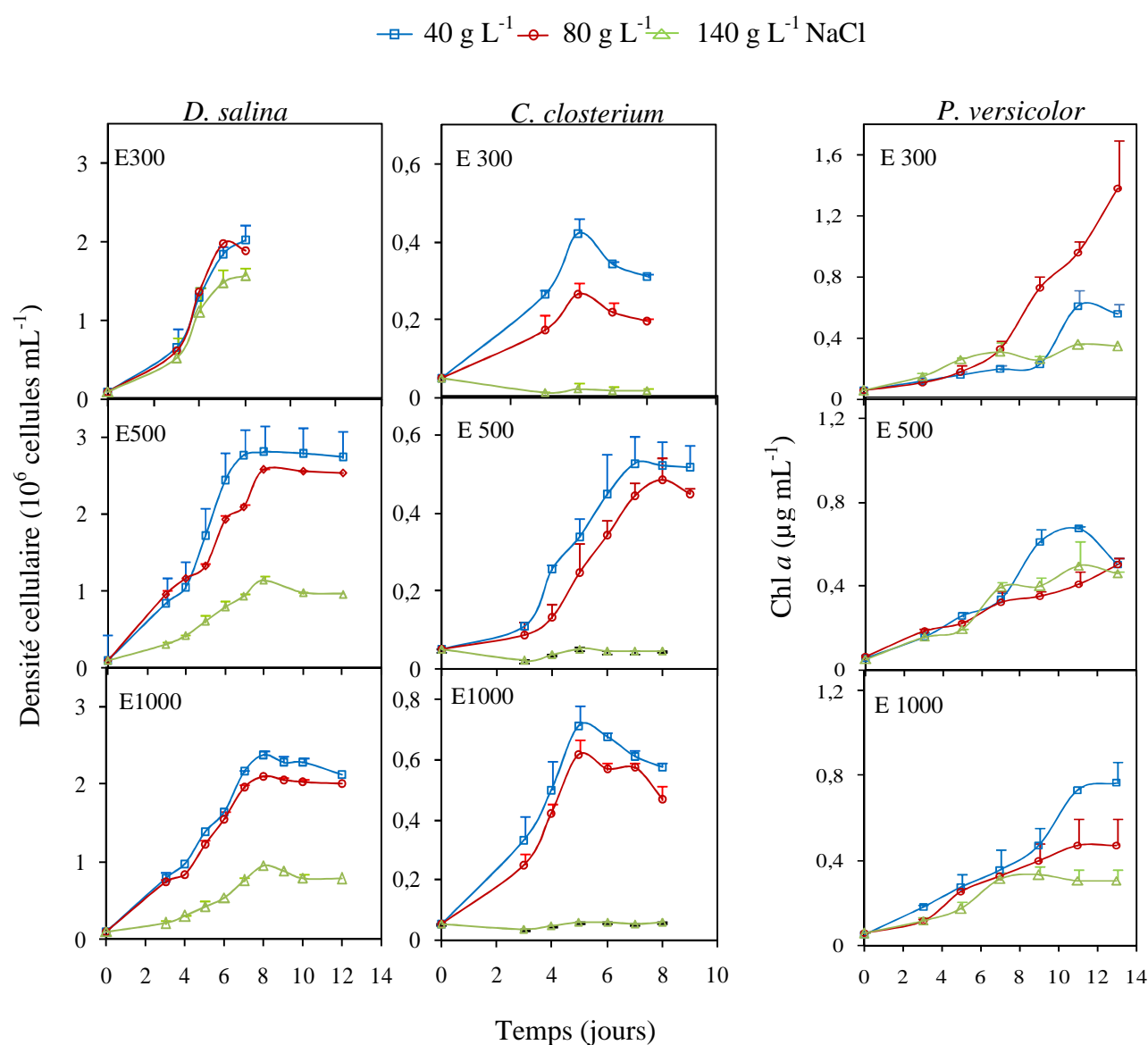


Figure 52. Courbes de croissance de *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans de l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 μmol photons m⁻² s⁻¹ (E300, E500 et E1000). Moyenne ± SD (n=3)

Tableau 7. Taux de croissance spécifique, temps de doublement et densité cellulaire (ou concentration en chlorophylle *a*) maximale de *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans de l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Moyenne \pm SD (n=3)

Taux de croissance (j^{-1})

Eclairement $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	E300			E500			E1000		
Concentration en NaCl g L ⁻¹	40	80	140	40	80	140	40	80	140
<i>D. salina</i>	0,30 $\pm 0,16$	0,37 $\pm 0,13$	0,35 $\pm 0,15$	0,15 $\pm 0,02$	0,16 $\pm 0,02$	0,12 $\pm 0,02$	0,11 $\pm 0,00$	0,13 $\pm 0,01$	0,13 $\pm 0,01$
<i>C. closterium</i>	0,20 $\pm 0,03$	0,19 $\pm 0,15$	0,21 $\pm 0,14$	0,11 $\pm 0,05$	0,11 $\pm 0,02$	-	0,17 $\pm 0,05$	0,20 $\pm 0,01$	-
<i>P. versicolor</i>	0,23 $\pm 0,20$	0,39 $\pm 0,20$	0,71 $\pm 0,16$	0,12 $\pm 0,05$	0,52 $\pm 0,08$	0,46 $\pm 0,10$	0,17 $\pm 0,02$	0,63 $\pm 0,28$	1,04 $\pm 0,18$

Temps de doublement (j)

Eclairement $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	E300			E500			E1000		
Concentration en NaCl g L ⁻¹	40	80	140	40	80	140	40	80	140
<i>D. salina</i>	0,43 $\pm 0,15$	0,52 $\pm 0,18$	0,51 $\pm 0,22$	0,21 $\pm 0,02$	0,22 $\pm 0,07$	0,17 $\pm 0,02$	0,16 $\pm 0,005$	0,19 $\pm 0,005$	0,18 $\pm 0,01$
<i>C. closterium</i>	0,28 $\pm 0,04$	0,28 $\pm 0,22$	0,30 $\pm 0,20$	0,16 $\pm 0,07$	0,16 $\pm 0,02$	-	0,16 $\pm 0,005$	0,19 $\pm 0,01$	-
<i>P. versicolor</i>	0,54 $\pm 0,09$	0,56 $\pm 0,28$	1,02 $\pm 0,24$	0,18 $\pm 0,10$	0,8 $\pm 0,07$	0,6 $\pm 0,09$	0,25 $\pm 0,03$	0,9 $\pm 0,41$	1,51 $\pm 0,27$

Densité cellulaire maximale (10^6 cellules mL^{-1})

Eclairement $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$	E300			E500			E1000		
Concentration en NaCl g L^{-1}	40	80	140	40	80	140	40	80	140
<i>D. salina</i>	2,02	2,00	1,61	2,89	2,57	1,13	2,37	2,09	0,95
	$\pm 0,15$	$\pm 0,12$	$\pm 0,10$	$\pm 0,16$	$\pm 0,02$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$	$\pm 0,00$	$\pm 0,01$
<i>C. closterium</i>	0,42	0,27	0,22	0,53	0,49	0,06	0,72	0,62	0,06
	$\pm 0,04$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$	$\pm 0,01$	$\pm 0,06$	$\pm 0,05$	$\pm 0,00$
Concentration maximale en Chl <i>a</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)									
<i>P. versicolor</i>	0,61	1,38	0,35	0,67	0,50	0,52	0,79	0,51	0,34
	$\pm 0,11$	$\pm 0,31$	$\pm 0,01$	$\pm 0,01$	$\pm 0,03$	$\pm 0,10$	$\pm 0,07$	$\pm 0,07$	$\pm 0,04$

Tableau 8. Effet de la salinité, de l'éclairement et leur interaction sur le taux de croissance spécifique et le temps de doublement chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans de l'eau de mer artificielle (Analyse de variance de deux facteurs avec répétition d'expérience). d.d.l = 18. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001

<i>Dunaliella salina</i>		
	taux de croissance spécifique	temps de doublement
Source de variation	F	F
Eclairement	16,86***	16,86***
Salinité	0,28*	0,28*
Eclairement X salinité	0,20*	0,20
<i>Cylindrotheca closterium</i>		
Source de variation	F	F
Eclairement	6,56**	6,56**
Salinité	4,69*	4,69*
Eclairement X salinité	1,87*	1,87
<i>Phormidium versicolor</i>		
Source de variation	F	F
Eclairement	6,20**	6,20**
Salinité	26,84***	26,84***
Eclairement X salinité	4,77*	4,77*

1.2. Effet du NaCl sur les concentrations en chlorophylles *a*, *b* et *c* et en caroténoïdes

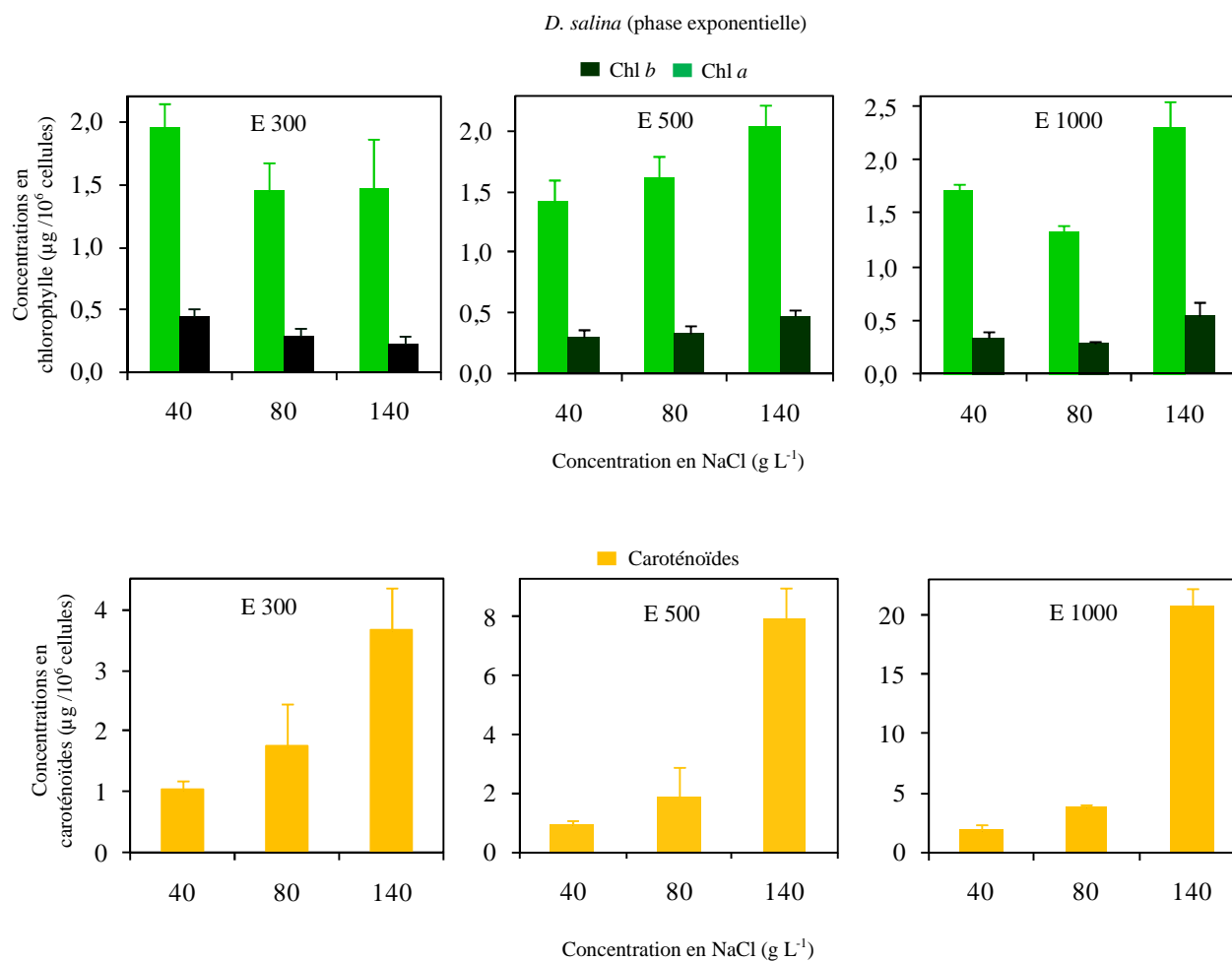
Les concentrations en Chl *a*, *b* et *c* et en caroténoïdes des cultures des trois espèces étudiées, maintenues sous un éclairnement de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en présence des trois concentrations en NaCl, sont présentées sur la figure 53.

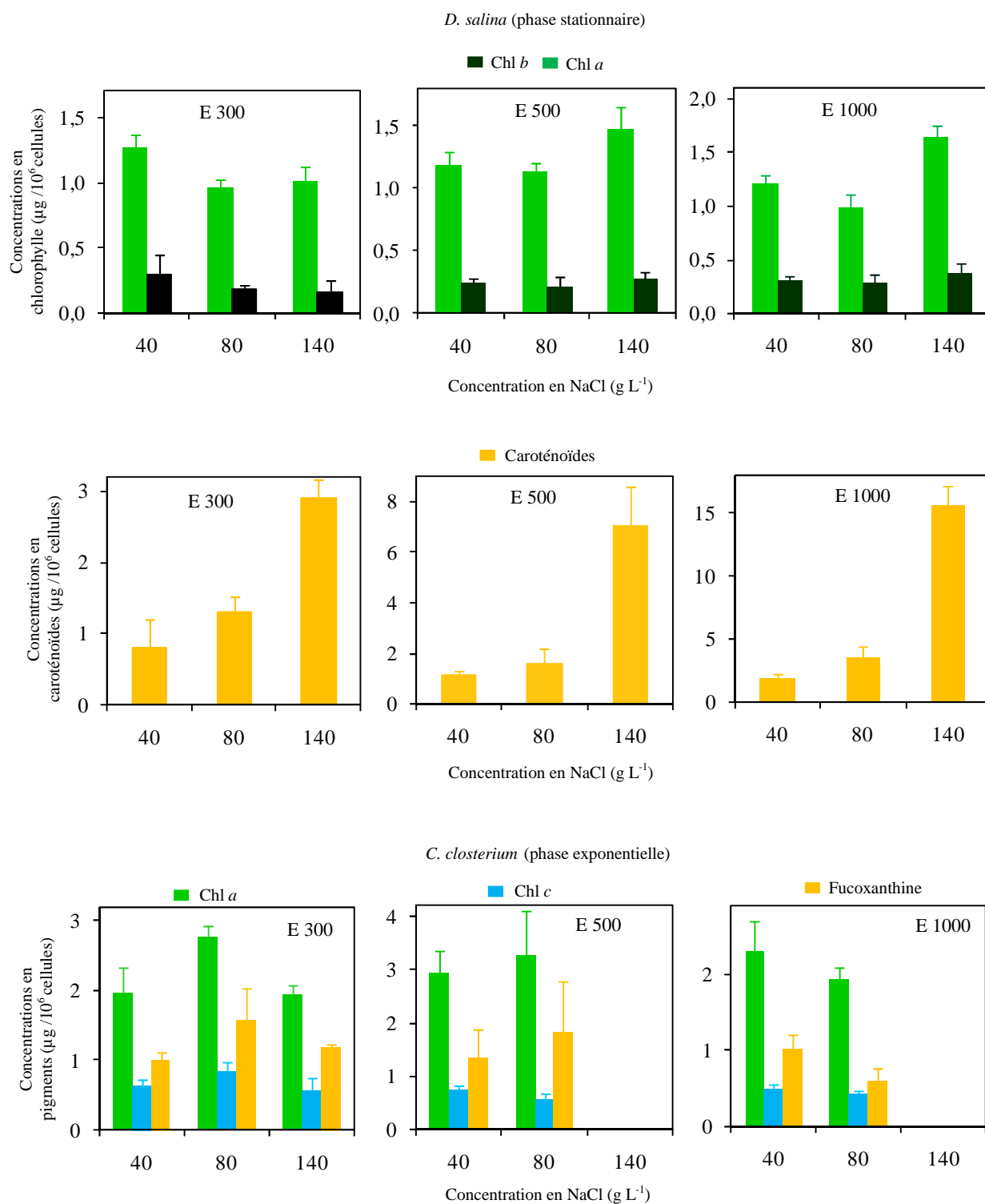
Chez *D. salina*, les teneurs en Chl *a* augmentent significativement lorsque la salinité augmente pendant la phase exponentielle de croissance, ainsi que pendant la phase stationnaire sous E500 et E1000 (Tableau 9). L'augmentation du niveau d'éclairnement provoque une diminution non significative de la concentration en Chl *a* à 40 g L^{-1} de NaCl pendant la phase exponentielle ($F= 1,26$; d.d.l = 18 ; $P > 0,05$) alors qu'elle provoque une augmentation significative en présence de NaCl 140 g L^{-1} en phase stationnaire ($F= 9,53$; d.d.l = 18 ; $P < 0,01$) (Tableau 9). De plus, l'analyse de variance révèle une interaction significative entre le NaCl et l'éclairnement aussi bien en phase exponentielle qu'en phase stationnaire (Tableau 9). La teneur en Chl *b* est environ trois fois plus faible que celle de la Chl*a*. Sa plus forte concentration atteint seulement 0,55 $\mu\text{g} / 10^6$ cellules. La teneur en Chl *b* augmente significativement en phase exponentielle avec l'augmentation de la salinité à E500 et E1000 ($p<0,05$) (Tableau 9). L'augmentation du niveau d'éclairnement induit une faible augmentation de la teneur en Chl *b* bien visible à 140 g L^{-1} mais cette élévation n'est significative qu'en phase plateau ($P< 0,01$) (Tableau 9). En revanche, il existe un effet d'interaction entre ces deux facteurs pour les deux phases de croissance (Tableau 9). Plus la salinité augmente plus la teneur en pigments caroténoïdes augmente dans les cultures de *D. salina* en phase exponentielle et en phase stationnaire (Fig. 53, Tableau 9). La concentration la plus élevée en caroténoïdes est enregistrée avec la plus forte salinité et sous le plus fort éclairnement. Le niveau d'éclairnement induit une augmentation de la teneur en caroténoïdes au cours de la phase exponentielle et de la phase stationnaire (Tableau 9).

Chez *C. closterium*, on enregistre une variation hautement significative de la teneur en Chl *a* entre les salinités. En effet, la teneur en Chl *a* augmente entre NaCl 40 et 80 g L^{-1} puis diminue en présence de NaCl 140 g L^{-1} sous E300. Sous E500, la même variation est observée mais la concentration en Chl *a* est très faible à la plus forte salinité alors que sous E1000, la teneur en Chl *a* diminue significativement jusqu'à s'annuler avec NaCl 140 g L^{-1} . Il est à noter que les concentrations en chlorophylles ne sont pas détectables avec notre méthode de dosage en présence de 140 g L^{-1} de NaCl sous E500 et E1000. Le niveau d'éclairnement fait également fluctuer la concentration en Chl *a* en présence de NaCl 80 et 140 g L^{-1} . En présence de la salinité la plus élevée et sous E500 et E1000, il n'a pas été possible de détecter les

pigments. En effet, l'analyse de variance de deux facteurs avec répétition d'expérience confirme l'effet du NaCl et de l'éclairement ainsi que leurs interaction sur la teneur de ce pigment ($P < 0,001$) (Tableau 9). Les concentrations en Chl *c* dans les cultures de *C. closterium* décroissent significativement ($P < 0,001$) pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire lorsque la salinité augmente sous chacun des trois éclairagements (Tableau 9). L'augmentation du niveau d'éclairement induit une diminution hautement significative de la teneur en Chl *c* (ANOVA, $P < 0,001$) (Tableau 9). Il est à noter que ce pigment est fortement influencé par l'interaction de ces deux paramètres (ANOVA, $P < 0,001$) (Tableau 9). Dans les cultures de *C. closterium*, la concentration en fucoxanthine (caroténoïde caractéristique des diatomées) varie significativement pendant la phase exponentielle et plateau de croissance lorsque la salinité augmente (ANOVA, $P < 0,001$) (Tableau 9). En effet, la teneur en fucoxanthine augmente entre 40 et 80 g L⁻¹ de NaCl puis diminue en présence de la plus forte salinité pendant la phase stationnaire de croissance sous E300. Sous les deux autres niveaux d'éclairement, la teneur augmente entre NaCl 40 et 80 g L⁻¹ et est nulle à 140 g L⁻¹ de NaCl pendant la phase exponentielle et pendant la phase plateau. La fucoxanthine n'a pu être détectée avec la méthode utilisée à la salinité la plus élevée et sous E500 et E1000. De plus, l'augmentation du niveau d'éclairement provoque une diminution significative ($P < 0,01$) de la teneur en fucoxanthine en présence de NaCl 80 et 140 g L⁻¹ pendant les deux phases de croissances (Tableau 9). Les deux facteurs étudiés (NaCl et éclairage) interagissent et font fluctuer les concentrations de ce pigment (ANOVA, $P < 0,01$) (Tableau 9).

Chez *P. versicolor*, une diminution significative de la teneur en Chl *a* est observée quand la salinité augmente sous chacun des éclairagements appliqués ($F=34,53$; d.d.l =18 ; $p < 0,001$) (Fig. 53, Tableau 9). La salinité croissante induit une augmentation significative de la concentration en caroténoïdes sous les éclairagements E300 et E1000 (ANOVA, $P < 0,001$) (Tableau 9). L'augmentation du niveau d'éclairement induit une augmentation non significative (ANOVA, $P > 0,05$) de la concentration en Chl *a* à 80 g L⁻¹, par contre il diminue significativement la teneur en pigments caroténoïdes en présence de NaCl 40 g L⁻¹ et les augmente avec NaCl 80 g L⁻¹ (ANOVA, $P < 0,001$) (Tableau 9 c). L'analyse de variance montre que les caroténoïdes sont fortement influencés par l'effet synergique des éclairagements et du NaCl ($P < 0,001$) (Tableau 9).





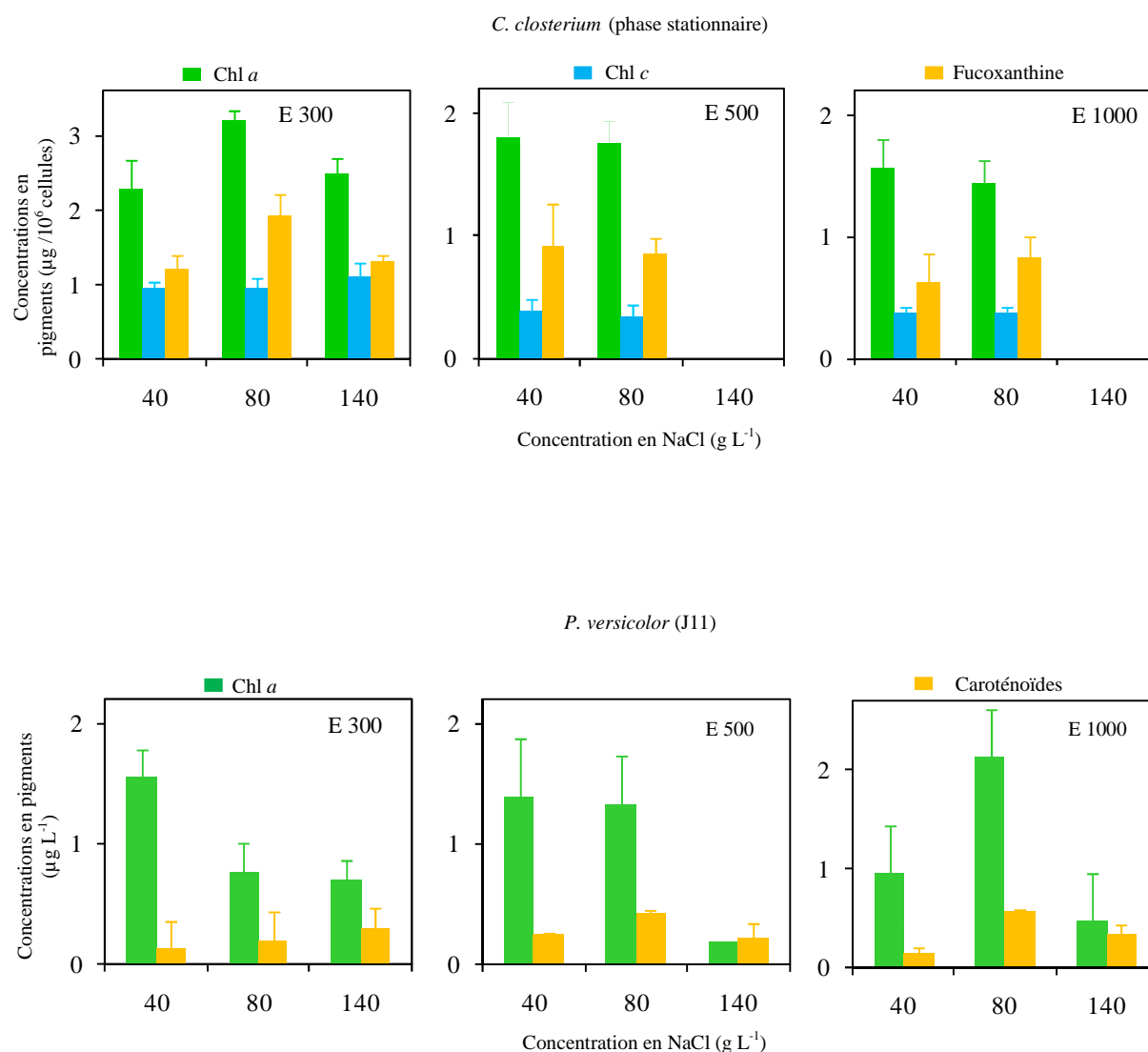


Figure 53. Concentrations en chlorophylles *a*, *b*, *c* et en pigments caroténoïdes ($\mu\text{g mL}^{-1}$) chez *Dunaliella salina*, *Cylindrothecaclosterium* et *Phormidiumversicolor* cultivés dans l'eau de mer artificielle renfermant 40, 80 et 140 g L^{-1} de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E300, E500 et E1000) pendant la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Moyenne \pm SD (n=3)

Tableau 9. Effet de la salinité, de l'éclairement et leur interaction sur la teneur en Chl *a*, Chl *b* ou *c* et caroténoïdes ou fucoxanthine chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* pendant la phase exponentielle de croissance (A) et la phase stationnaire (B). Analyse de variance de deux facteurs avec répétition d'expérience. d.d.l =18.

*p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001

<i>Dunaliella salina</i>						
	A			B		
	chl <i>a</i>	chl <i>b</i>	caroténoïdes	chl <i>a</i>	chl <i>b</i>	caroténoïdes
Source de variation	F	F	F	F	F	F
Eclairement	1,26*	2,23*	174,44***	9,53*	8,46*	97,83*
Salinité	9,37**	4,18*	377,26***	23,28***	1,92	206,18*
Eclairement X salinité	7,49***	6,02**	103,80***	10,13***	2,80*	46,86*
<i>Cylindrotheca closterium</i>						
	chl <i>a</i>	chl <i>c</i>	fucoxanthine	chl <i>a</i>	chl <i>c</i>	fucoxanthine
Eclairement	12,06***	33,83***	7,34**	195,76***	194,88***	74,70***
Salinité	77,63***	56,23***	13,47***	114,09***	13,04***	36,42***
Eclairement X salinité	15,13***	9,07***	4,7**	24,31***	10,69***	5,97**
<i>Phormidium versicolor</i>						
Source de variation	chl <i>a</i>		caroténoïdes			
Eclairement	1,70*		21,43***			
Salinité	34,53***		74,77***			
Eclairement X salinité	12,49***		29,47***			

La taille des antennes collectrices de la lumière chez les deux microalgues dans les différentes conditions expérimentales a été estimée par le rapport Chl *a*/ Chl *b* ou Chl *a*/ Chl *c* (Tableau 10).

Chez *C. closterium*, le rapport Chl *a*/ Chl *c* montre une variation non significative lorsque le niveau d'éclairement augmente ($P>0,05$) (Tableau 11). Le test statistique ANOVA montre que la taille des antennes est fortement influencée par l'ajout de NaCl en interaction avec le niveau d'éclairement ($P<0,001$) (Tableau 11). Chez *D. salina*, le rapport Chl *a*/Chl *b* diminue sous l'effet de lumière en présence de NaCl 140 g L^{-1} mais cette diminution n'est pas significative ($P>0,05$), la taille des antennes est inchangée sous l'effet de l'éclairement et de la salinité ($P>0,05$) (Tableau 11).

Tableau 10. Estimation de la taille des antennes chez *Dunaliella salina* (Chl *a*/ Chl *b*) et *Cylindrotheca closterium* (Chl *a*/ Chl *c*) cultivées dans l'eau de mer artificielle renfermant 40, 80 et 140 g L^{-1} de NaCl sous un éclairement de 300, 500 et $1000 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ pendant la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Moyenne \pm DS ($n=3$)

<i>Dunaliella salina</i>							
Eclairement $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$		exponentielle			Stationnaire		
		E300	E500	E1000	E300	E500	E1000
Concentration en NaCl g L^{-1}	40	$4,71 \pm 1,03$	$4,79 \pm 1,28$	$4,94 \pm 0,59$	$4,40 \pm 0,93$	$4,90 \pm 0,68$	$4,10 \pm 0,79$
	80	$5,13 \pm 0,41$	$5,13 \pm 1,18$	$4,58 \pm 0,19$	$5,31 \pm 0,95$	$5,57 \pm 1,96$	$3,53 \pm 1,06$
	140	$6,81 \pm 1,26$	$4,16 \pm 0,50$	$4,39 \pm 1,02$	$6,29 \pm 1,09$	$4,95 \pm 0,58$	$4,65 \pm 1,31$
<i>Cylindrotheca closterium</i>							
Eclairement $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$		exponentielle			Stationnaire		
		E300	E500	E1000	E300	E500	E1000
Concentration en NaCl g L^{-1}	40	$3,11 \pm 0,51$	$4,07 \pm 0,54$	$4,59 \pm 0,32$	$2,38 \pm 0,19$	$4,63 \pm 0,45$	$4,20 \pm 0,58$
	80	$3,34 \pm 0,36$	$5,74 \pm 1,25$	$4,52 \pm 0,65$	$3,39 \pm 0,61$	$5,33 \pm 1,22$	$3,78 \pm 0,16$
	140	$3,52 \pm 0,76$	-	-	$2,29 \pm 0,55$	-	-

Tableau 11. Effet de la salinité, de l'éclairement et leur interaction sur la taille des antennes, sur l'intensité respiratoire et la photosynthèse nette chez *Dunaliella salina* et *Cylindrotheca closterium* pendant la phase exponentielle (A) et en phase stationnaire (B). Analyse de variance de deux facteurs avec répétition d'expérience, d.d.l = 18. *p<0,05; **p<0,01, ***p<0,001

<i>Dunaliella salina</i>						
	Taille des antennes		respiration		photosynthèse nette	
	A	B	A	B	A	B
Source de variation	F	F	F	F	F	F
Eclairement	2,83*	3,23*	1,46*	76,96***	11,56***	4,42*
Salinité	0,24*	1,25*	5,53*	36,49***	147,87***	65,63***
Eclairement X salinité	2,65*	0,99*	1,04*	93,47***	7,20**	1,98*
<i>Cylindrotheca closterium</i>						
	Taille des antennes		respiration		photosynthèse nette	
	A	B	A	B	A	B
Source de variation	F	F	F	F	F	F
Eclairement	0,57*	4,11*	45,34***	7,98**	9,38**	16,37***
Salinité	76,98***	102,96***	310,52***	83,38***	142,20***	145,84***
Eclairement X salinité	24,34***	19,01***	18,15***	7,06**	12,52***	12,18***
<i>Phormidium versicolor</i>						
	Taille des antennes		respiration		photosynthèse nette	
Source de variation	F		F		F	
Eclairement	26,03***		4,3*		4,3*	
Salinité	26,47***		40,16**		40,16**	
Eclairement X salinité	1,25*		1,36*		1,36*	

1.3. La respiration

L'intensité respiratoire des trois espèces cultivées en présence des trois concentrations en NaCl et sous les trois niveaux d'éclairement a été mesurée à l'obscurité par oxymétrie (Tableau 12). L'intensité respiratoire chez les deux micro-algues et la cyanobactérie tend à décroître lorsque la salinité augmente. Le test statistique montre que l'ajout de NaCl diminue significativement la respiration chez *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor* en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance (Tableau 11). De même, le niveau d'éclairement a un effet significatif sur l'intensité respiratoire : une augmentation en phase stationnaire chez *D. salina*, une diminution en phase exponentielle et stationnaire chez *C. Closterium* et une diminution chez *P. versicolor* en phase exponentielle. L'interaction entre ces deux paramètres est significative chez *Dunaliella salina* et *Cylindrotheca closterium* (Tableau 11).

Tableau 12. Intensité respiratoire de *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance. Moyenne \pm SD (n = 3)

Respiration ($\mu\text{mol O}_2 \text{mg}^{-1} \text{Chl } a \text{ h}^{-1}$)

Phase exponentielle									
Eclairage ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E300			E500			E1000		
Concentration en NaCl g L ⁻¹	40	80	140	40	80	140	40	80	140
<i>D. salina</i>	91,8 $\pm 16,8$	95 $\pm 28,9$	46,7 $\pm 3,3$	122,4 $\pm 58,1$	64,5 $\pm 44,4$	69,3 $\pm 15,5$	119,5 ± 24	117,3 $\pm 36,3$	70,9 $\pm 16,7$
<i>C. closterium</i>	64,5 $\pm 4,3$	43,1 $\pm 3,8$	26,2 $\pm 1,5$	64,6 $\pm 5,1$	56,8 $\pm 9,4$	-	42,3 $\pm 3,9$	36,3 $\pm 0,7$	-
<i>P. versicolor</i>	73,8 $\pm 6,5$	65,1 $\pm 16,2$	39,7 $\pm 0,4$	49,8 $\pm 9,1$	38,8 $\pm 6,9$	28,8 $\pm 1,9$	47,1 $\pm 5,6$	35,8 $\pm 1,3$	26,1 $\pm 5,1$
Phase stationnaire									
<i>D. salina</i>	120,8 ± 24	82,1 $\pm 7,6$	44,4 $\pm 6,8$	166,8 $\pm 31,3$	49,3 $\pm 18,3$	57,28 $\pm 15,2$	114,8 $\pm 26,9$	109,9 $\pm 27,2$	42,7 $\pm 10,2$
<i>C. closterium</i>	51,1 ± 15	44,3 $\pm 10,3$	23,2 $\pm 3,6$	79,5 $\pm 11,8$	-	-	46,1 $\pm 6,6$	36,3 $\pm 3,4$	-

1.4. L'activité photosynthétique

La photosynthèse nette ainsi que les paramètres de fluorescence de la Chl a ont été mesurés pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire de la croissance de *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor* sous différents niveaux d'éclairement : E300, E500 et E1000 et en présence de 40, 80 et 140 g L $^{-1}$ de NaCl.

1.4.1. Effet du NaCl et de l'éclairement sur la photosynthèse nette

Les courbes montrant l'évolution de la photosynthèse nette (Pn) chez les espèces cultivées sont présentées Figure 54. On peut remarquer que l'intensité photosynthétique (IP) est beaucoup plus élevée chez la Chlorophycée que chez la cyanobactérie et la diatomée.

Chez *D. salina*, l'ajout de NaCl dans l'EMA entraîne une diminution de la Pn sous les différents éclairagements pendant la phase exponentielle et la phase plateau. Le tableau 11 montre qu'il y a un effet hautement significatif de l'éclairement et de la salinité sur l'activité photosynthétique en phase exponentielle et stationnaire ($P < 0,001$) (Tableau 11). L'effet de l'éclairement s'ajoute à celui du NaCl en phase exponentielle (Tableau 11). L'interaction de ces deux facteurs a un effet significatif sur la photosynthèse nette seulement en phase exponentielle ($F = 7,20$; d.d.l = 18 ; $P < 0,001$) (Tableau 11). Il existe un effet combiné du NaCl et de l'éclairement (Tableau 11). En revanche, la lumière stimule significativement Pn à 40 g L $^{-1}$ de NaCl pendant la phase exponentielle de croissance.

Chez *P. versicolor*, la Pn semble également diminuer principalement sous l'effet du NaCl ($P < 0,01$) (Tableau 11) mais l'ANOVA ne révèle pas d'interaction significative entre la salinité et la lumière ($F = 1,36$; d.d.l = 18 ; $P > 0,05$) (Tableau 11).

Parmi les trois espèces, *C. closterium* présente la Pn la plus faible dans les différentes conditions expérimentales. L'impact du sel en synergie avec le niveau d'éclairement est plus accentué pour cette espèce dans les deux phases de croissance (ANOVA : $P < 0,001$) (Tableau 11). On enregistre une inhibition totale de la Pn pour les éclairagements E500 et E1000 en présence de NaCl 140 g L $^{-1}$. Cette diminution est hautement significative, en phase exponentielle (interaction entre salinité et éclairage : $p < 0,00$) et en phase stationnaire (interaction entre salinité et éclairage : $p < 0,00$) (Tableau 11).

La concentration en sel et le niveau d'éclairement sont donc deux facteurs qui interagissent sur l'activité photosynthétique pendant des deux phases de croissance étudiées. Ces résultats sont à comparer avec les courbes de croissance. En effet, plus la photosynthèse est élevée, plus la croissance de la micro-algue devrait être stimulée. Nos résultats vérifient bien

cette relation. Par exemple, les plus fortes productions de biomasse de la Chlorophycée ont été obtenues avec 40 et 80 g L⁻¹ de NaCl et sous E500 et E1000 respectivement, les IP les plus élevées ont été mesurées dans les mêmes conditions en phase exponentielle de croissance (Fig. 54).

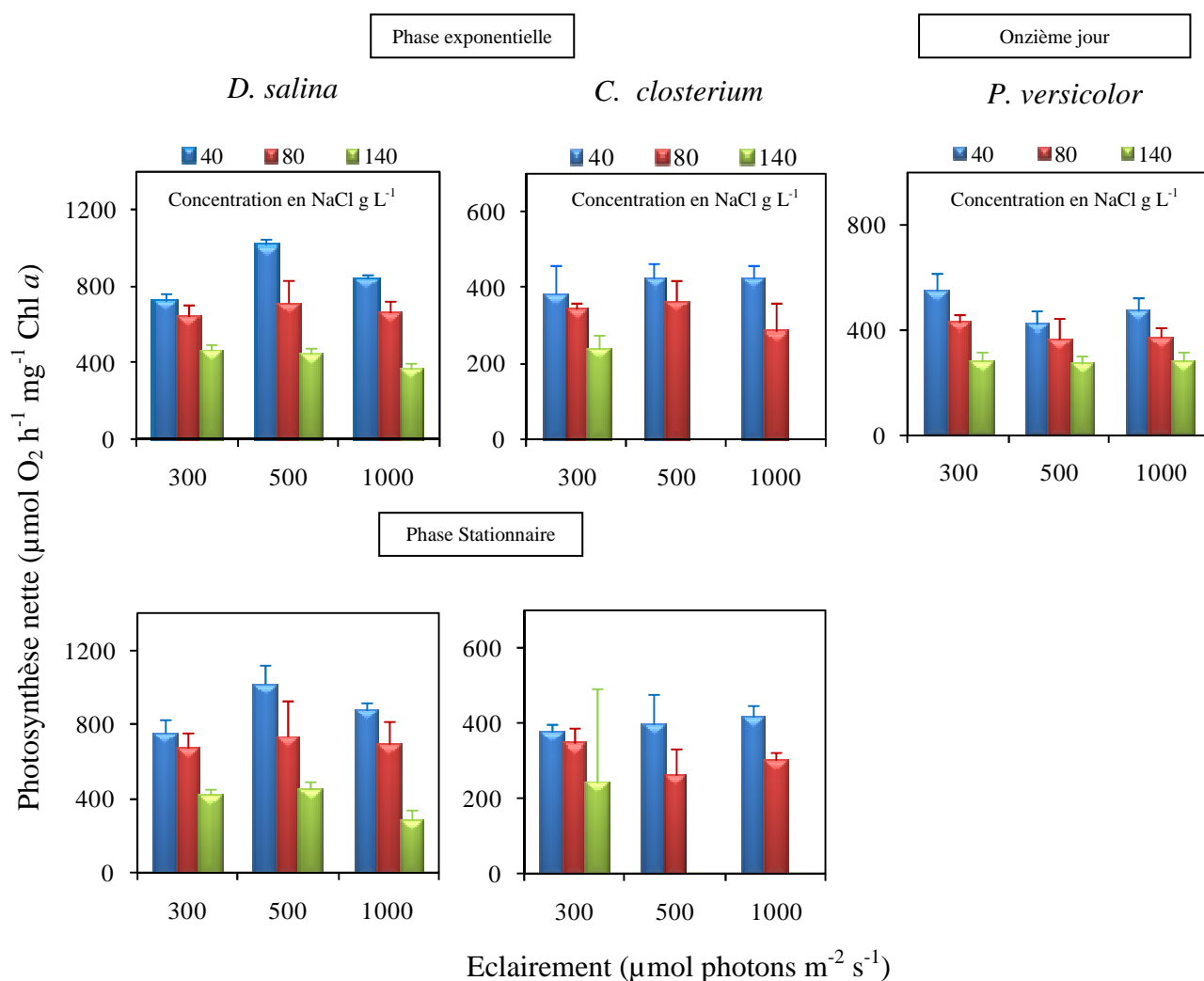


Figure 54. Photosynthèse nette chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 300, 500 et 1000 μmol photons m⁻² s⁻¹ (E300, E500 et E1000) pendant la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Moyenne ± SD (n=3)

1.4.2. Effet du NaCl et de l'éclairement sur les paramètres de fluorescence de la Chl *a*

Le rendement quantique maximum (F_v/F_m), le rendement quantique effectif du PSII (Φ_{PS2}) et le quenching non photochimique (QNP) ont été déterminés chez *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor* cultivés en présence de trois concentrations en NaCl (40, 80 et 140 g L⁻¹) et sous les éclairagements E300, E500 et E1000 (Fig. 55).

Chez *D. salina*, F_v/F_m est égal à environ 0,7. En effet, le tableau 13 montre qu'il n'y a pas d'effet significatif de l'éclairement et de la salinité sur F_v/F_m . Néanmoins, il existe une interaction significative des deux facteurs (Tableau 13). Φ_{PS2} reste stable (environ 0,3) pendant les deux phases de croissance aux trois salinités sous E300, alors qu'il diminue avec l'ajout de NaCl sous les deux autres niveaux d'éclairement. Cette diminution, sous l'effet du NaCl, est significative pendant la phase stationnaire (ANOVA, $P < 0,01$) (Tableau 13). Toutefois, la lumière est également une contrainte qui contribue à la diminution du Φ_{PS2} en phase plateau et exponentielle (Tableau 13). L'effet combiné de ces deux contraintes (éclairement et NaCl) sur ce paramètre est significatif en phase stationnaire seulement ($F = 2,94$; d.d.l = 18 ; $p < 0,05$) (Tableau 13).

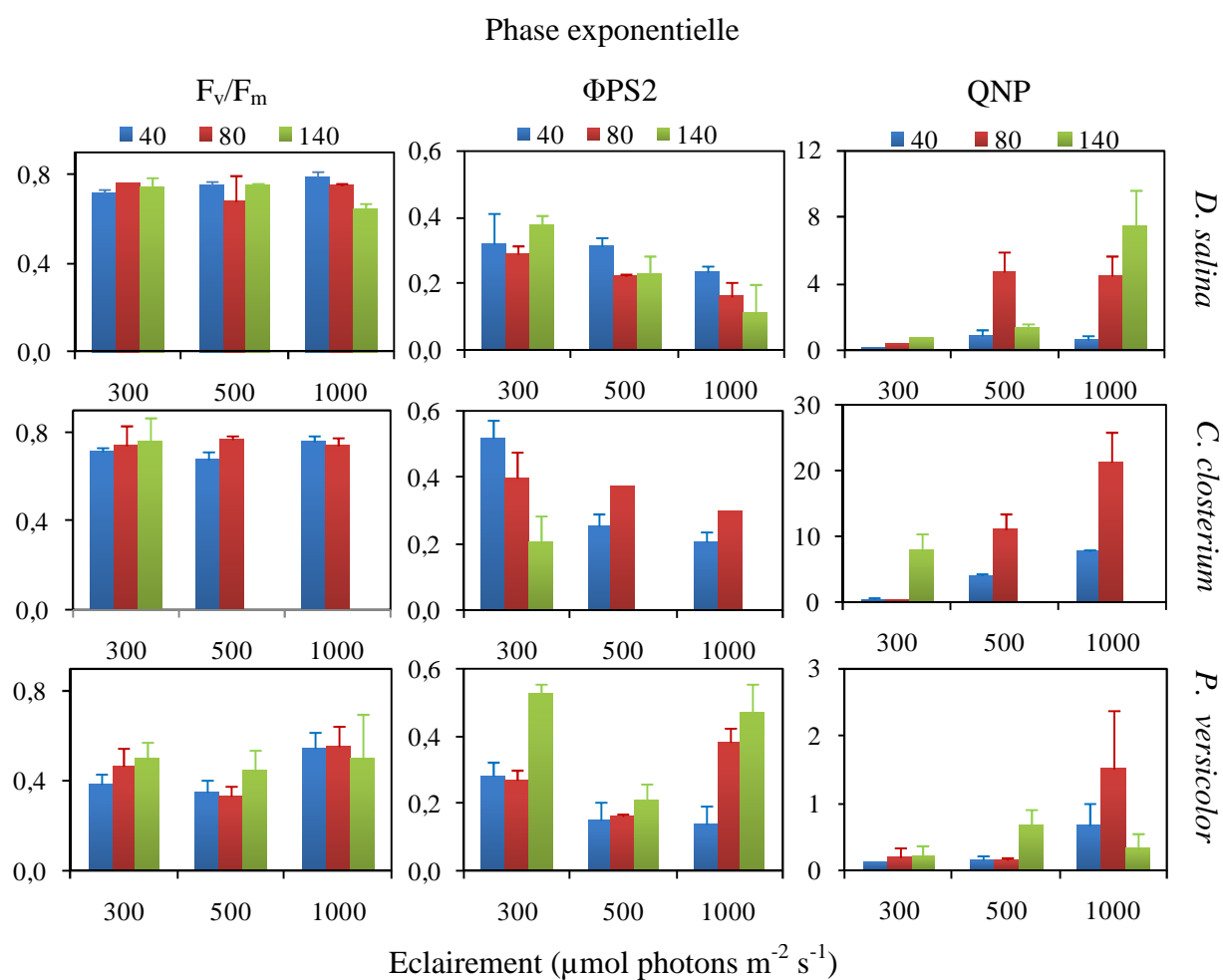
Le QNP augmente avec la teneur en NaCl et le niveau d'éclairement. Le test ANOVA indique une augmentation hautement significative ($P < 0,001$) des valeurs de QNP sous l'effet du NaCl aux différents niveaux d'éclairement pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire (Tableau 13). Cette différence est particulièrement bien visible sous E1000 (Fig. 54). Ces différents paramètres indiquent que la Chlorophycée subit un stress salin et lumineux qui sont combinés lorsque ces deux facteurs sont élevés, perturbant ainsi l'appareil photosynthétique.

Chez *C. closterium*, F_v/F_m est inférieur à 0,8 quelle que soient la salinité et le niveau d'éclairement. On enregistre que ce paramètre est fortement influencé par l'ajout du NaCl et de l'éclairement pendant les deux phases de croissance (ANOVA ; $P < 0,0001$) (Tableau 13). En effet, ce rapport atteint l'inhibition totale aux forts éclairagements (Tableau 13). La valeur de Φ_{PS2} diminue significativement avec l'augmentation de la salinité sous E300 en phase exponentielle et stationnaire de croissance ($P < 0,001$) (Tableau 13). Ce rendement diminue de moitié en présence de NaCl 140 g L⁻¹ par rapport à la plus faible salinité (Fig. 54). Φ_{PS2} ne dépasse pas la valeur de $0,37 \pm 0,02$ sous les deux autres éclairagements pendant les deux phases de croissance. Le test ANOVA révèle une augmentation significative de Φ_{PS2} sous

l'effet du fort éclaircissement en phase exponentielle de croissance en présence de NaCl 80 g L⁻¹ par rapport à la plus faible salinité. Ce paramètre est donc influencé par le niveau de salinité ($P < 0,001$) (Tableau 13). La lumière affecte également ce paramètre. En effet, la valeur $\Phi PS2$ diminue significativement lorsque le niveau d'éclaircissement augmente en phase exponentielle et en phase stationnaire ($P < 0,001$) (Tableau 13).

Chez *C. closterium*, la valeur de QNP varie entre 0,5 et 21. QNP augmente avec l'augmentation de la salinité en phase exponentielle de croissance et pendant la phase plateau (Tableau 13). Cette augmentation est particulièrement élevée sous E1000, la valeur de QNP étant d'environ 21 en présence de NaCl 80 g L⁻¹. Le niveau d'éclaircissement pendant la croissance est un paramètre qui influence également QNP. En effet, une augmentation significative de la valeur de QNP avec l'augmentation du niveau d'éclaircissement est observée pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire (ANOVA, $P < 0,001$) (Tableau 13). L'appareil photosynthétique de cette diatomée est plus affecté par le NaCl et la lumière que celui de la Chlorophycée.

Chez *P. versicolor*, les valeurs de F_v/F_m sont plus faibles que celles enregistrées chez les deux micro-algues et atteignent seulement 0,55 (Fig. 55). Le niveau d'éclaircissement pendant la culture affecte significativement le rendement quantique maximum ($F = 6,43$; d.d.l = 18 ; $p < 0,01$) (Tableau 13) : une augmentation avec NaCl 40 g L⁻¹ et une diminution suivie d'une augmentation avec NaCl 80 g L⁻¹. $\Phi PS2$ tend à augmenter avec l'augmentation de la salinité sous les trois éclaircissements (Tableau 13). L'analyse de variance révèle que le niveau d'éclaircissement pendant la culture influence significativement les valeurs $\Phi PS2$ ($P < 0,001$) (Tableau 13) : une diminution à 40 g L⁻¹, une diminution suivie d'une élévation à 80 g L⁻¹ et une diminution suivie d'une élévation à 140 g L⁻¹. QNP augmente avec l'augmentation du niveau d'éclaircissement et de la salinité. Toutefois, ANOVA montre un effet significatif de l'éclaircissement sur QNP ($P < 0,01$) (Tableau 13). Les deux contraintes du milieu perturbent le fonctionnement de l'appareil photosynthétique lorsque le niveau de ces contraintes est élevé.



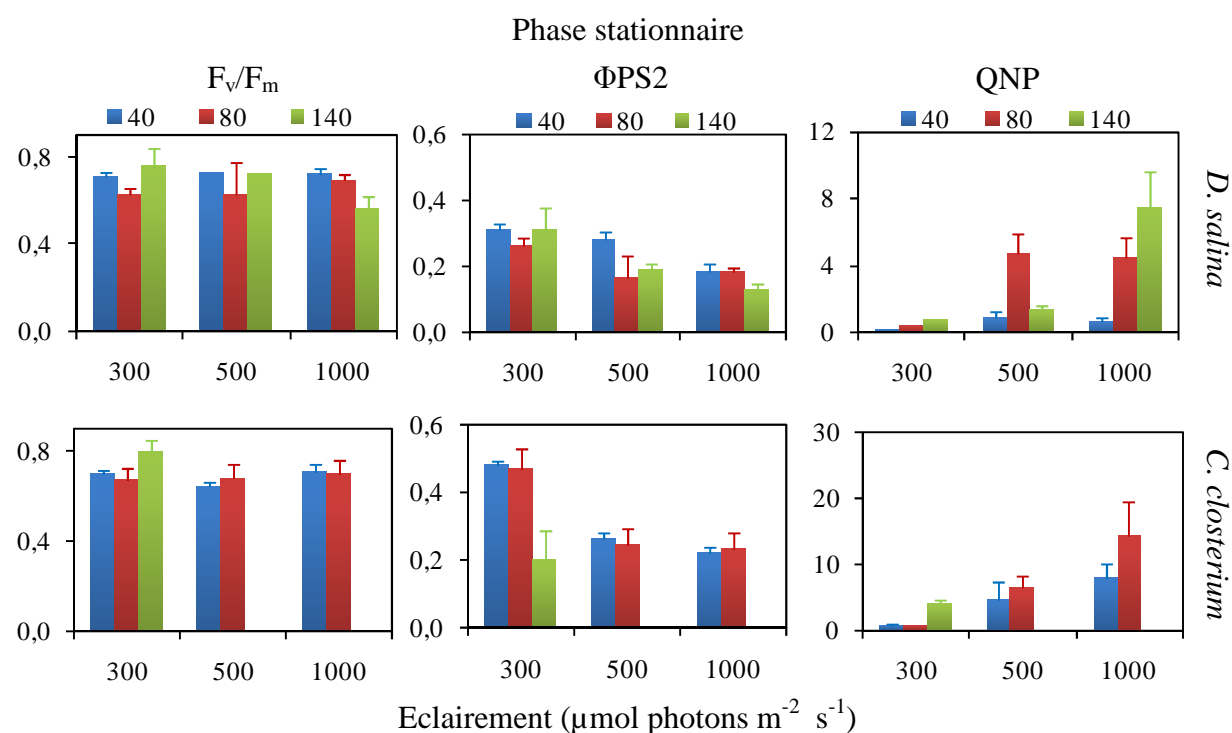


Figure 55. Effet du NaCl et de l'éclairement sur le rendement quantique maximal (F_v/F_m), le rendement quantique effectif du PS II (Φ_{PS2}) et le quenching non photochimique (QNP) chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans de l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairement de 300, 500 et 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pendant la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. Moyenne \pm SD (n=3)

Tableau 13. Effet de la salinité, de l'éclairement et leur interaction sur le rendement quantique maximal (F_v/F_m), sur le rendement quantique effectif du PS II ($\Phi PS2$) et sur le quenching non photochimique (QNP) chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* pendant la phase exponentielle (A) et en phase plateau (B) cultivés dans de l'eau de mer artificielle (Analyse de variance de deux facteurs avec répétition d'expérience). d.d.l = 18.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

<i>Dunaliella salina</i>						
	F_v/F_m		$\Phi PS2$		QNP	
	A	B	A	B	A	B
Source de variation	F	F	F	F	F	F
Eclairement	0,25*	1,16*	9,24**	30,85***	459,14***	40,91***
Salinité	1,89*	2,71*	1,88*	6,21**	130,64***	26,56***
Eclairement X salinité	4,65***	4,36*	0,98*	2,94*	120,64***	17,20***
<i>Cylindrotheca closterium</i>						
	A	B	A	B	A	B
Source de variation	F	F	F	F	F	F
Eclairement	70,51***	121,74***	32,82***	87,41***	29,49***	15,95***
Salinité	260,57***	301,40***	70,90***	109,84***	46,84***	16,04***
Eclairement X salinité	73,81***	120,36***	4,56*	0,38*	45,16***	13,28***
<i>Phormidium versicolor</i>						
Source de variation	F		F		F	
Eclairement	6,43**		38,84***		9,27**	
Salinité	0,83*		44,54***		1,99*	
Eclairement X salinité	1,03*		11,48***		5,08**	

1.5. Les activités enzymatiques anti-oxydantes

L'effet du NaCl sur les activités enzymatiques anti-oxydantes (APX, CAT et SOD) a été mesuré pendant la phase exponentielle de croissance de *D. salina*, de *C. closterium* et de *P. versicolor* cultivés uniquement sous E1000 (Fig. 56). En effet, ces activités enzymatiques sont extrêmement faibles chez les trois espèces cultivées sous E300 et E500.

1.5.1. Activité de la superoxyde dismutase

L'activité de la SOD est relativement faible chez *D. salina* par rapport à celle mesurée chez *C. closterium* et *P. versicolor*. En effet, elle ne dépasse pas $8,59 \pm 0,91$ U.E. mg^{-1} protéines en présence de 140 g L^{-1} de NaCl. Elle est environ deux fois plus élevée chez *C. closterium* et *P. versicolor* à la plus forte salinité. L'activité de cette enzyme augmente significativement chez *D. salina* ($F= 24,68$; d.d.l = 6; $P> 0,01$), *C. closterium* ($F= 8,67$; d.d.l = 6; $P> 0,05$) et *P. versicolor* ($F= 29,78$; d.d.l = 6; $P> 0,001$) lorsque la salinité augmente.

1.5.2. Activité de la catalase

L'activité de la catalase la plus élevée a été mesurée chez *C. closterium* ($5,45 \pm 2,21$ U.E. mg^{-1} protéines) et la plus faible chez *D. salina* ($0,55 \pm 0,20$ U.E. mg^{-1} protéines) en présence de 140 g L^{-1} de NaCl. L'activité de la catalase augmente significativement (*D. salina* : $F= 8,68$; d.d.l = 6; $P> 0,05$; *C. closterium* : $F= 6,20$; d.d.l = 6; $P> 0,05$, *P. versicolor* : $F= 8,21$; d.d.l = 6; $P> 0,05$) chez les trois espèces lorsque la salinité augmente.

1.5.3. Activité de l'ascorbate peroxydase

L'activité de l'APX chez les deux micro-algues varie entre $0,34 \pm 0,09$ et $1,81 \pm 0,37$ U.E. mg^{-1} protéines. L'activité de cette enzyme n'a pas été détectée chez *P. versicolor*. Chez *C. closterium*, l'augmentation de l'activité APX est significative quand la salinité augmente ($F= 23,76$; d.d.l = 6; $P> 0,01$). Aucune variation significative de l'activité APX n'a été observée chez *D. salina*.

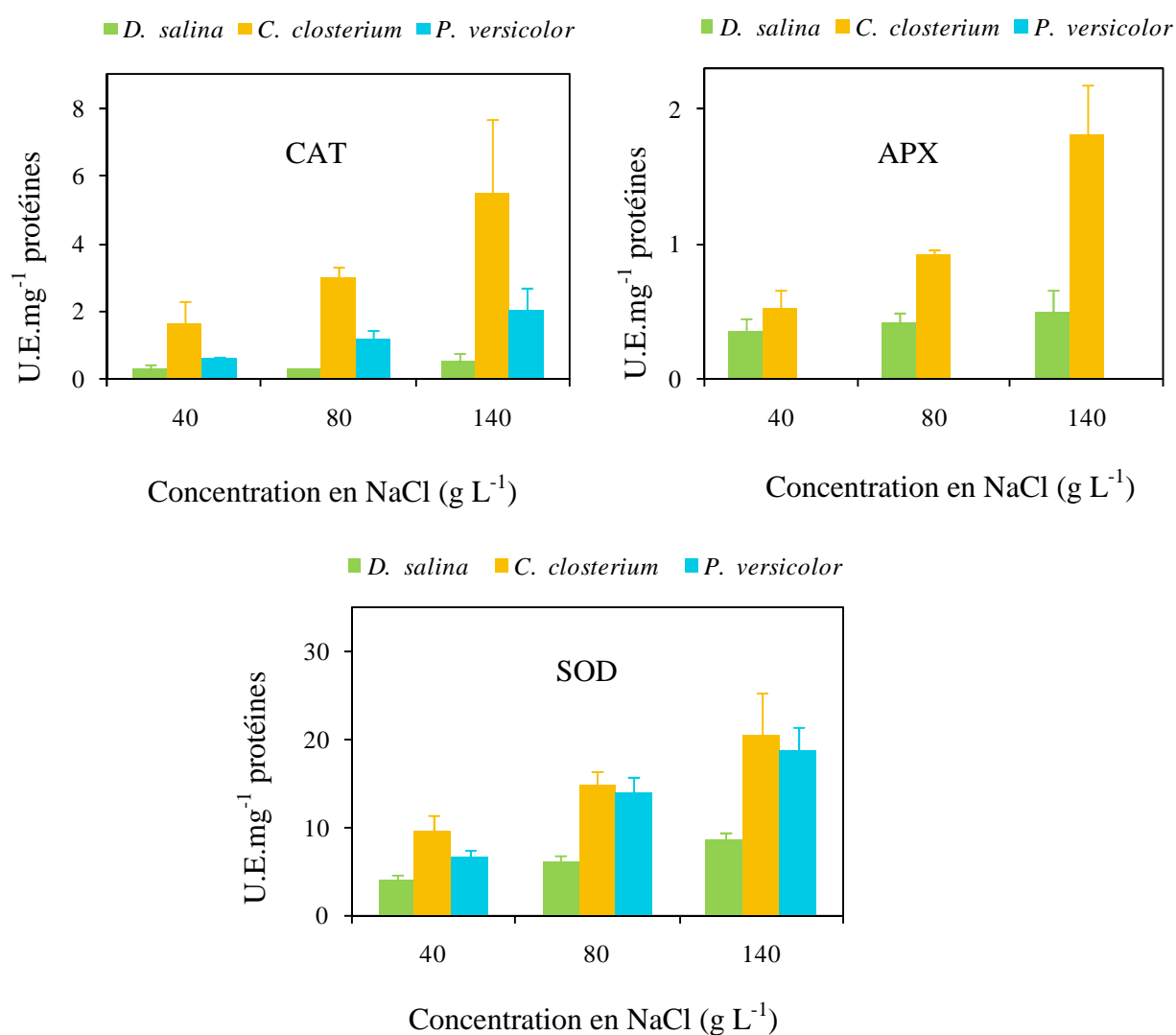


Figure 56. Activité de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de l'ascorbate peroxydase (APX) chez *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* cultivés dans l'eau de mer artificielle contenant 40, 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl sous un éclairage de 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Moyennes \pm SD (n = 3).

2. Discussion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à trois paramètres : la croissance, l'activité photosynthétique et l'activité enzymatique anti-oxydante. A travers ces paramètres, nous avons pu constater que les trois espèces étudiées présentent des niveaux de tolérance au sel différant selon le niveau d'éclairement. En premier lieu, on enregistre une diminution de la croissance, variable selon l'espèce, avec l'augmentation de la salinité. En effet, le stress salin est un facteur environnemental qui limite la croissance et la productivité des plantes (Boyer, 1982) et des micro-algues (Leon et Galván, 1999; Kirrolia et al., 2011; Bremauntz et al., 2011; Guangfeng et al., 2012). Leon et Galwan (1999) ont montré une diminution de la croissance de 1,5 à 0,45 $\mu\text{g Chl } a \text{ h}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ chez *Chlamydomonas reinhardtii* lorsque la salinité varie de 0 à 200 mM. Des résultats similaires ont été obtenus par Guangfeng et al. (2012) chez *C. reinhardtii* ; Kirrolia et al. (2011) chez *Scenedesmus quadricauda*. Les travaux de Batterton et Baalen (1971) ont montré que la présence de NaCl 8 à 10 % inhibe la croissance chez les cyanobactéries et que les variations d'éclairement, de température, de pH, ou de la composition du milieu de base n'ont pas réussi à atténuer ce stress. Bremauntz et al. (2011) ont constaté que la croissance de *Chlorella* sp. est inhibée en présence de 23,4 et 35,1 g L⁻¹ de NaCl sous 100 mol m⁻² s⁻¹. Dans nos conditions expérimentales, la salinité diminue la croissance aux différents niveaux d'éclairement chez *P. versicolor* et inhibe la croissance chez *C. closterium* en présence de 140 g L⁻¹ de NaCl à partir de 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. L'impact du NaCl sur la croissance est insignifiant chez *D. salina*, marqué chez *P. versicolor* et très significatif chez la diatomée *C. closterium*. Ces réponses au stress salin dépendent des mécanismes physiologiques mis en jeu chez chaque espèce. *D. salina*, à l'exception des autres Chlorophycées, est dépourvue de paroi rigide, ce qui lui donne la capacité de s'adapter à des concentrations élevées en NaCl atteignant la saturation (Pisale et Lele, 2005). Selon Chen et Jiang (2009), cette capacité d'adaptation est due à la plasticité de la membrane plasmique. La microscopie électronique après cryodécapage des cellules de *D. salina* révèle que la membrane plasmique est en relation avec de petites vésicules de diamètre inférieur à 0,25 μm situées dans le cytoplasme, ces vésicules servant de « réservoir à membrane » qui permettent une augmentation ou une diminution rapide du volume cellulaire, empêchant l'apoptose des cellules, alors qu'en présence de 165 g L⁻¹ de NaCl, les cellules de *Chlamydomonas* sp. se dépigmentent suite aux dommages causés au niveau de la membrane plasmique, comme la peroxydation des lipides (Guangfeng et al., 2012). Les diatomées sont dotées d'un frustule composé de silice amorphe (Scala et Bowler, 2001). L'exposition de

Cyclotella meneghiniana à différentes concentrations en sel (4 à 18 mg L⁻¹) déminéralise le frustule en diminuant les teneurs en silice qu'il renferme (Saros et Fritz, 2000). Ce phénomène fragilise probablement les diatomées et les rend plus vulnérable au sel.

Dans nos conditions expérimentales, le taux de croissance des deux micro-algues varie entre 0,37 et 0,11 j⁻¹ et entre 0,2 et 1 j⁻¹ chez la cyanobactérie. Ce paramètre ne varie pas significativement lorsque les conditions de culture varient, à l'exception de *D. salina* chez laquelle il diminue significativement lorsque le niveau d'éclairement augmente en présence de 80 et 140 g L⁻¹ de NaCl. De même, Hagemann et al. (1987) ont observé une diminution du taux de croissance chez *Microcystis firma* de 0,085 h⁻¹ à 0,055 h⁻¹ suite à une augmentation de la concentration en NaCl de 2 à 684 mM. Les travaux de Moulton et al. (1987) montrent que les deux paramètres : salinité et éclairement interviennent sur le taux de croissance; le taux de croissance de *D. salina* diminue de 0,39 à 0,3 j⁻¹ lorsque le niveau d'éclairement augmente de 72 à 800 μmol photons m⁻² s⁻¹ à une salinité égale à 197 g L⁻¹, diminue de 0,28 à 0,24 j⁻¹ sous les mêmes niveaux d'éclairement à une salinité égale à 284 g L⁻¹. Selon Gómez et Gonzâlez. (2005), le taux de croissance dépend de la température et non de l'éclairement. Ces auteurs ont calculé les taux de croissance de 7 souches de *D. salina* originaires de différents pays et cultivées dans de l'eau de mer enrichie avec le milieu Provasoli, renfermant 125 g L⁻¹ de NaCl, sous un éclairement de 40 et 110 μmol photons m⁻² s⁻¹. Les taux de croissance varient de 0,6 à 1 j⁻¹ à 26 °C et de 0,2 à 0,6 à 15 °C. Les taux de croissance sont identiques pour une même souche, quel que soit le niveau d'éclairement, à une même température. L'absence d'effet de l'éclairement sur le taux de croissance est sans doute due aux faibles niveaux d'éclairement (non stressants) choisis par rapport à ceux que nous avons appliqués.

Les pigments caroténoïdes participent à la photosynthèse en absorbant la lumière, notamment les longueurs d'onde comprises entre 400 et 550 nm. Ces pigments participent aussi à la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse lorsque le cycle des xanthophylles fonctionne, ils servent de filtre protégeant l'appareil photosynthétique de la photo-oxydation (Salguero et al., 2003), ils ont de plus des propriétés anti-oxydantes (Gómez et Gonzâlez, 2005). Selon ces auteurs, les propriétés anti-oxydantes des caroténoïdes évitent la peroxydation des lipides de l'appareil photosynthétique en piégeant l'oxygène singulet et en dissipant l'énergie lumineuse sous forme de chaleur à travers le cycle des xanthophylles.

La synthèse des caroténoïdes est stimulée lorsque les micro-algues sont placées dans des conditions contraignantes comme une carence en éléments nutritifs, un fort éclairement ou une concentration élevée en sel (Ben-amotz et Avron, 1983; Pisal et Lele, 2005 ; Salguero

et al., 2003). Nos expérimentations confirment, chez les trois espèces phytoplanctoniques étudiées, l'impact du niveau de la salinité et de l'éclairement sur ces pigments. D'après Gômez et Gonzâlez (2005), la concentration en caroténoïdes peut atteindre $33,9 \mu\text{g } 10^{-6}$ cellules sous $110 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ chez une souche australienne de *D. salina* en phase plateau. Nos résultats confirment que les forts éclaircements stimulent la synthèse des caroténoïdes (Wafaa et al., 2012 ; Ben-amotz et Avron, 1983), surtout dans les cultures de *D. salina*.

Les teneurs en Chl *a* et Chl *b* chez *D. salina* enregistrent une augmentation significative avec l'augmentation de la salinité, confirmant les résultats obtenus précédemment par Mishra et al. (2008). Ainsi, l'intensité photosynthétique de *D. salina* est maintenue, voire améliorée, lorsque la salinité augmente, permettant la synthèse de glycérol et d'autres métabolites de stress (Fulda et al., 1990; Liska et al., 2004). Janssen et al. (2000) ont montré que chez certaines micro-algues comme *Chlamydomonas reinhardtii*, les antennes collectrices de la lumière augmentent de taille, le nombre de photosystèmes restant inchangé, afin de s'acclimater aux contraintes de l'environnement; chez d'autres espèces comme *Dunaliella tertiolecta* le nombre de photosystèmes augmente tout en gardant la taille des antennes inchangée. Les rapports Chl *a*/ Chl *b* et Chl *a*/ Chl *c* sont des indicateurs de la taille des antennes de l'appareil photosynthétique (Perrine et al., 2012; Beneragama et Goto, 2010; Melis, 2009; Gordillo et al., 2001). Dans notre étude, la taille des antennes reste inchangée chez *D. salina* aux différents niveaux d'éclairement et aux trois salinités, à l'exception de la salinité 140 g L^{-1} où leur taille augmente lorsque le niveau d'éclairement est élevé (Tableau 9). Baroli et Melis (1998) ont aussi observé chez *D. salina* une diminution de taille des antennes collectrices en réponse à un fort éclaircissement ($2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). En revanche chez *C. closterium*, la taille des antennes diminue en fonction du niveau d'éclairement croissant aux différentes salinités. Nos résultats montrent que l'appareil photosynthétique de *D. salina* résiste aux contraintes de l'environnement tout en gardant un niveau d'activité élevé. En effet, l'IP et la croissance sont peu affectées en fonction de la salinité et de l'éclairement croissants. Chez *C. closterium*, la diminution de la taille des antennes collectrices permettrait de diminuer la quantité d'énergie solaire collectée et la photochimie, plus d'énergie lumineuse serait inutilisée. Cette acclimatation conduit à une diminution de la croissance (Fig. 51) et une dissipation thermique (NPQ) élevée (Fig. 54).

Les teneurs en Chl *a* et Chl *c* chez *C. closterium* varient sous l'effet de la salinité et la lumière. Rijstenbil (2003) a montré que les rayons UVB et le stress salin (70 p.s.u)

provoquent des diminutions significatives des teneurs en Chl *a*, Chl *c* et en fucoxanthine chez *C. closterium*. Chez *Amphora coffeaeformis*, la teneur en Chl *a* augmente de 0,05 à 0,42 $\mu\text{g g}^{-1}$ de matière sèche lorsque la salinité augmente de 5 g L^{-1} à 35 g L^{-1} mais elle chute à 0,24 $\mu\text{g g}^{-1}$ de matière sèche lorsque la salinité est égale à 40 (Sigaud et Aidar, 1993). Chez *Phaeodactylum tricornutum*, la teneur en Chl *a* est égale à 0,5 $\mu\text{g } 10^{-6}$ cellules lorsque la salinité varie entre 20 et 40 g L^{-1} , tandis qu'elle est de l'ordre de 0,2 $\mu\text{g } 10^{-6}$ cellules chez *Chaetoceros* sp. pour les mêmes conditions (Sigaud et Aidar, 1993). Ces études montrent que chaque espèce présente un seuil de tolérance au sel. Pour *C. closterium*, le seuil de tolérance au sel est inférieur à 140 g L^{-1} de NaCl ajouté. Plusieurs travaux confirment que les diatomées telles que *Amphora* spp., *Navicula* spp., *Nitzschia* spp., *C. closterium*, *Pleurosigma* spp. et *Synedra* spp. sont présentes dans leurs milieux naturels dans une gamme de salinité comprise entre 60 et 140 g L^{-1} (DasSarma et Arora, 2001; Dolapsakis et al., 2005; Nagasathya et Thajuddin, 2008).

Chez la cyanobactérie *Scytonema javanicum*, l'analyse des pigments a montré qu'une augmentation de la salinité diminue la concentration en Chl *a* (Tang et al., 2007, Hu et al., 2013); cette diminution est significative lorsque la teneur en NaCl passe de 0,171 à 0,684 mol L^{-1} . Ben Dhiab (2012) a constaté que l'augmentation de la concentration en sel de 17 mM à 500 mM améliore la croissance de *Arthrospira platensis* (52 $\mu\text{g Chl } a \text{ mL}^{-1}$ à 70 $\mu\text{g Chl } a \text{ mL}^{-1}$) sous les éclaircements 50 et 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivement. Dans notre étude, l'ajout du NaCl contribue à la diminution de la teneur en Chl *a* chez *P. versicolor*.

Chez *Nostoc spongiaeforme* et *Phormidium corium*, la teneur en Chl *a* diminue d'une manière considérable lorsque les cellules sont exposées à une élévation du niveau d'éclairement de 80 à 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Bhandari et Shatma, 2006).

Chez *P. versicolor*, les niveaux d'éclairement stimulent la synthèse de Chl *a* en présence de NaCl 80 (E300, E500 et E1000) et 140 (E500 et E1000) g L^{-1} . Lorsque la concentration en NaCl est augmentée de 0,2 à 0,4 M, la teneur en Chl *a* diminue chez *Spirulina* sp. tandis que la teneur en caroténoïdes ne change pas de manière significative (Deniz et al., 2011). Dans notre étude, la synthèse des caroténoïdes est stimulée chez *P. versicolor* en présence de NaCl 80 g L^{-1} .

L'intensité de la photosynthèse (IP) tend globalement à diminuer sous l'effet du sel aux différents niveaux d'éclairement. Vonshak et al. (1988), Vonshak et al. (1996) et Zeng et Vonshak (1998) ont montré que l'augmentation de la salinité (NaCl 0,5-1M) conduit à la

diminution de la photosynthèse chez *Spirulina platensis* sous différents niveaux d'éclairement (80, 100, 200 et 3500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Selon Vonshak et al. (1996), cette diminution représente une régulation de l'activité photosynthétique plutôt qu'un réel dommage. Dans notre étude, une faible diminution de l'IP a été mesurée chez *D. salina* en fonction de la salinité croissante. Cette diminution est plus importante chez *P. versicolor* et atteint l'inhibition totale chez *C. closterium* à la plus forte salinité testée. Il apparaît ainsi que *D. salina* et *P. versicolor* possèdent des mécanismes de défense contre le stress salin plus performants que chez *C. closterium*. Selon Berry et al. (2003b), les souches de *Spirulina platensis* sont dotées de mécanismes d'adaptation au sel au niveau de la membrane cytoplasmique, la membrane des thylakoïdes et le cytoplasme : transport d'électron cyclique au niveau du PSI générant l'ATP qui assure l'efflux de Na^+ via une pompe Na^+ -ATPase hors des cellules.

Neidhardt et al. (1998) et Melis et al. (1999) ont montré que la photosynthèse de *D. salina* est stimulée sous l'effet de l'éclairement (100, 500, 1000 et 2000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en présence de NaCl 1,5 M. Nous avons enregistré une élévation significative de l'activité photosynthétique chez *D. salina* en fonction du niveau croissant de l'éclairement seulement en présence de NaCl 40 g L^{-1} .

L'intensité respiratoire diminue de 72 à 43,2 $\mu\text{mol O}_2 \text{h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Chl } a$ sous E20 chez la cyanobactérie *Arthrospira platensis* lorsque la concentration en NaCl augmente de 17 mM à 250 mM (Ben Dhiab, 2012). Ces résultats corroborent ceux que nous avons obtenus avec nos espèces étudiées.

L'état du PS2 a été estimé par la mesure de la fluorescence de la Chl *a*.

Le rendement quantique maximal (F_v/F_m) présente une valeur presque constante d'environ 0,7 chez les deux micro-algues, quelles que soient les conditions expérimentales, à l'exception du plus fort éclairement et de la salinité la plus élevée ; il est plus faible chez *P. versicolor* où il est de l'ordre de 0,55. Le rapport F_v/F_m est défini comme un indice de l'efficacité photochimique maximale de PSII (Bjorkman et Demming, 1987) qui dépend à la fois de F_0 et de F_v . Chez les cyanobactéries, la fluorescence des phycobiliprotéines interfère avec la fluorescence de la chlorophylle qui conduit à une augmentation de F_0 et donc à une diminution des valeurs de F_v/F_m (Buchel et Wilhem, 1993; Papageorgiou et Govindjee, 1968; Papageorgiou, 1996; Schreiber et al., 1986 ; Ben Dhiab, 2012). Par ailleurs, le flash saturant provoque le détachement des phycobiliprotéines de l'appareil photosynthétique et ainsi une

diminution de la fluorescence (Kaňa et al., 2009). Par conséquent, les valeurs de F_v/F_m demeurent plus faibles (0,55) chez la cyanobactérie que chez les micro-algues (Fig. 54). Cette réaction est un mécanisme photo-protecteur qui préserve l'appareil photosynthétique contre les forts éclaircissements. Nymark et al. (2009) ont montré que chez *Phaeodactylum tricornutum*, F_v/F_m varie entre 0,5 et 0,7 lorsque l'espèce est cultivée dans le milieu synthétique f/2 sous 35 et 500 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. F_v/F_m a été largement utilisé pour évaluer l'ampleur de la photo-inhibition chez les micro-algues. Par exemple, chez *D. viridis*, F_v/F_m diminue de 0,7 à 0,35 respectivement sous E250 et E1500 (Gordillo et al., 2001). Ainsi, le plus fort éclaircissement réduit le rendement quantique maximum de cette espèce. La diminution de F_v/F_m peut à la fois être un indicateur des dommages causés au PS II ou un indice de régulation de la capacité de transport des électrons au niveau du PS II, ce qui implique la dissipation thermique de l'énergie d'excitation excédentaire (Osmond, 1994). Dans notre étude, ce rapport indique que l'espèce *D. salina* régule mieux la capacité de transport des électrons au niveau du PS II que les deux autres espèces. Herrmann et al. (1996) ont mis en évidence l'effet inhibiteur d'une exposition de 30 min aux rayons UV sur l'activité photosynthétique de *D. salina* en mesurant F_v/F_m qui diminue alors de 0,65 à 0,35. Dans notre étude, *C. closterium* enregistre une inhibition du rendement quantique maximum aux plus forts éclaircissements (E500, E100) et à la salinité la plus élevée (140 g L⁻¹).

Le niveau d'éclaircissement et la salinité influencent le rendement quantique effectif (ΦPS2) pendant la phase exponentielle et la phase stationnaire chez les 3 espèces étudiées. Selon Nishiyama et al. (2006), la lumière est un paramètre essentiel à l'activité photosynthétique, mais elle peut causer des dommages à l'appareil photosynthétique. L'exposition des organismes à un fort éclaircissement se traduit souvent par une inhibition sévère de l'activité du PSII (Powles, 1984). Ce phénomène est connu sous le nom de photo-inhibition du PSII. Selon les espèces, il se produit à partir d'un certain niveau d'éclaircissement; par conséquent, il est inévitable chez les organismes photosynthétiques (Nishiyama et al., 2006). Les organismes photosynthétiques sont cependant capables de surmonter les dommages et de réparer rapidement le PSII dans des conditions d'éclaircissement « normales » (Prásil et al., 1992). Le taux de dommage est proportionnel à l'intensité de l'éclaircissement (Nishiyama, 2004). Lorsque les cellules photosynthétiques sont exposées à une faible intensité lumineuse, le taux de réparation est plus élevé que le taux de dommages et, par conséquent, la photo-inhibition ne se manifeste pas apparemment. Cependant, lorsque les cellules sont exposées à un fort éclaircissement, le taux de dommages dépasse le taux de réparation; il en résulte

l'apparition de la photo-inhibition du PSII (Nishiyama et al., 2006). Le mécanisme de photo-inhibition est déclenché par plusieurs paramètres environnementaux (Murata et al., 2007). Ces auteurs proposent que la photo-inhibition agit directement sur le PSII, en générant les ROS qui inhibent ainsi la réparation de PSII endommagé. L'étude d'Allakhverdiev et al. (2000a) montre que le stress salin subi par les cellules de *Synechococcus* sp. PCC 7942 en présence de NaCl 0,5 M inactive à la fois le PSII et le PSI. En milieu naturel, le stress salin et le stress lumineux s'additionnent souvent. Le stress salin augmente la photo-inhibition du PSII chez les plantes terrestres (Sharma et Hall, 1991), *C. reinhardtii* (Neale et Melis, 1989) et *Synechocystis* sp. (Lu et Zhang, 1999; Allakhverdiev et al., 2002 ; Allakhverdiev et Murata, 2004; Murata et al., 2007) et chez *spirulina platensis* (Lu et zhang, 1999). Il reste à déterminer si le stress salin provoque directement des dommages au PSII (Nishiyama et al., 2006). Les effets du stress salin seul sur les dommages et le taux de réparation du PSII ont été étudiés chez la cyanobactérie *Synechocystis* (Allakhverdiev et Murata, 2004). Le stress salin, à raison de 0,5 M (29 g L⁻¹) de NaCl, inhibe la réparation du PSII mais n'accélère pas la détérioration du PSII. Ces constatations ont été confirmées par Murata et al. (2007). Ainsi, il apparaît que la photo-inhibition stimulée dans des études antérieures aurait pu être due à des effets synergiques des stress lumineux et salin, à savoir, les dommages causés par la lumière et l'inhibition de la réparation par le sel. En effet, Allakhverdiev et al. (2002) ont montré qu'une incubation de courte durée des cellules de *Synechocystis* sp. PCC 6803 avec du NaCl 0,5 M sous E500 inactive rapidement le PSII. Mais après 120 min dans ces conditions, les cellules retrouvent 50 % de leur activité initiale. Lorsque les cellules sont incubées avec NaCl 1 M également sous E500, l'activité du PSII diminue encore plus rapidement, et aucune activité n'a été détectée après 120 min de traitement. Ces résultats montrent que l'exposition des cellules à un stress lumineux ou un stress salin entraîne l'inactivation partielle du PSII. En revanche la combinaison des deux types de stress induit une très forte inactivation du PSII. Il existe donc un effet de synergie entre les fortes intensités de l'éclairement et les fortes teneurs en sel. Dans notre étude, les 3 espèces subissent aussi un stress salin accentué par l'élévation du niveau d'éclairement.

Par ailleurs, le PSII joue un rôle clé dans la régulation du transport des électrons au niveau des chloroplastes (Baker, 1991). Chez *D. maritima*, un choc osmotique, provoqué par l'addition de NaCl (1; 1,5 ; 2 M), réduit immédiatement l'activité du PSII qui se traduit par une diminution immédiate des valeurs de Φ_{PS2} de 0,61 à 0,55, de 0,61 à 0,11 et de 0,60 à 0,04 respectivement (Zakhovskii et al., 2012). Après 200 min, la valeur se stabilise à 0,6 ; 0,55

et 0,35 respectivement. Les valeurs de Φ_{PS2} , que nous avons obtenues, diminuent chez les 3 espèces étudiées lorsque la salinité augmente. Selon Zakhozhii et al. (2012), la diminution de Φ_{PS2} , surtout lors de l'ajout de sodium 2 M, est due à des perturbations structurelles et fonctionnelles au niveau du PS II et de la chaîne de transport des électrons chez *D. maritima*. Malgré ces perturbations, l'appareil photosynthétique continue à fonctionner en produisant l'énergie nécessaire pour la synthèse du glycérol et l'expulsion des ions Na^+ à l'extérieur des cellules. Le PSI, qui est plus résistant au sel, joue un rôle crucial pour produire l'énergie nécessaire aux mécanismes de défense contre le stress (Zakhozhii et al., 2012). Bukhov et Carpentier (2004) ont montré que les voies de transport des électrons liées au PSI fournissent une flexibilité supplémentaire suite au stress environnemental comme le sel : transport d'électrons cyclique entre les deux photosystèmes assuré soit par la ferrédoxine, soit par la NADPH réductase, soit par la NAD(P)H déshydrogénase, soit par la plastoquinone réductase. Ceci explique le bon fonctionnement de l'appareil photosynthétique de *D. salina* malgré la diminution des valeurs du Φ_{PS2} sous l'effet du NaCl. Zakhozhii et al. (2012) et Liu et Shen (2004) ont constaté qu'un choc hypertonique (transfert de cellules cultivées en présence de NaCl 0,5 M dans des milieux avec NaCl 1 ; 1,5, et 2 M, et un transfert de cellules cultivées dans le milieu contenant NaCl 1,5 M dans un milieu avec NaCl 2,5 M respectivement), active la migration de la lumière captée au niveau du PSII vers le PSI et facilite ainsi le flux d'électrons vers le PSI. Ce flux dépend de la fluidité des membranes thylacoïdales et de l'aptitude de ces constituants à se déplacer et à inter-réagir (Bissati et al., 2000).

Zeng et Vonshak (1998) ont observé que les valeurs de Φ_{PS2} chez *Spirulina platensis*, après 25 h d'exposition au NaCl 0,5 M, diminue de 15 % sous un éclaircissement de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et de 90 % à 75 % sous $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Toutefois, après 80 h d'exposition au sel, l'activité de PSII retrouve son niveau initial. Chez la cyanobactérie que nous avons étudiée, les valeurs Φ_{PS2} augmentent avec la salinité à chacun des éclaircissements ; l'effet du niveau d'éclaircissement est moins net. Ben Dhiab (2012) suppose que l'effet du stress salin sur le PSII chez les cyanobactéries pourrait être attribué à une interaction directe entre le sel et le PS II grâce à des composants cellulaires encore inconnus, car les résultats évoluent au cours de l'acclimatation au stress salin.

L'extinction non photochimique (NPQ) nous renseigne sur la dissipation thermique de l'énergie lumineuse en excès. Cette dissipation est déclenchée et modulée via la dé-époxydation des xanthophylles (Nymark et al., 2009). Les xanthophylles sont des caroténoïdes oxygénés faisant partie de la structure fonctionnelle des antennes collectrices de

la lumière. Ces molécules participent au collecte de l'énergie lumineuse et à la photoprotection (dissipation de l'énergie en excès) (Gordillo et al., 2001 ; Perrine et al., 2012). Ce processus constitue un moyen de protection contre la formation des espèces réactives de l'oxygène et permet le maintien de l'équilibre entre l'énergie photonique absorbée et utilisée (Nymark et al., 2009).

Wu et al. (2011) montrent que les valeurs de NPQ augmentent de 0,2 à 0,8 chez *Thalassiosira pseudonana* et de 0,2 à 0,3 chez *Coscinodiscus radiatus* sous les éclairagements 450 et 14000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivement. Chez, *D. viridis*, la valeur NPQ est égale à 0,5 lorsque la culture est réalisée sous 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ alors qu'elle est égale à 0,6 sous 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Gordillo et al., 2001). Chez *Chlorella fusca*, NPQ est égal à 0,9 sous 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, suite à une élévation de l'intensité lumineuse la valeur augmente et atteint 2,5 et 3 sous 750 et 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivement (Mendoza et al., 2002). En plus de l'intensité lumineuse, la salinité est un facteur qui influence ce paramètre. Chez *Tetraselmis subcordiformis*, NPQ est de l'ordre de 0,05; 0,46; 0,3 et 0,4 une semaine après avoir ajouté du NaCl 5,4 ; 27 ; 54 et 67,5 g L⁻¹ sous 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Yao et al., 2013). Casper-Lindley et Björkman (1998) ont montré que les espèces *Euglena gracilis*, *Ochromonas danica*, *Phaeodactylum tricornutum*, et *Dunaliella tertiolecta*, cultivées sous 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ présentent des valeurs NPQ de l'ordre de 0,9 ; 2 ; 3 et 2 après 50 min d'exposition à un fort éclairage (E2000). Ces auteurs constatent que les valeurs sont égales à 1 pour les différentes espèces lorsque les cultures sont réalisées sous 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Dans notre étude, les valeurs de NPQ augmentent chez les trois espèces, lorsque la salinité et l'éclairage augmentent. *C. closterium* est l'espèce la plus affectée, puisque NPQ atteint la valeur de 21 (NaCl 80 g L⁻¹ et E 1000). Ces résultats peuvent être mis en relation avec ceux du suivi de la croissance. En effet, nous constatons que plus la croissance est affectée plus la valeur de NPQ est élevée. Les variations de NPQ observées donnent une indication sur l'apparition des processus de dissipation de l'énergie excédentaire grâce aux couples violaxanthine-zéaxanthine chez la Chlorophycée (Perrine et al., 2012) et diatoxanthine-diadinoxanthine chez la diatomée (Nymark et al., 2009) lorsque les cellules sont soumises aux contraintes du milieu.

Lorsque nous comparons les différents paramètres mesurés, nous constatons que l'ajout de NaCl ainsi que l'élévation du niveau d'éclairage diminuent la croissance des deux micro-algues. En effet, la croissance de *D. salina* est légèrement diminuée à la plus forte salinité sous E500 et E1000 par rapport à celle mesurée sous E300 ; dans ces conditions, une

faible activité photosynthétique et une faible valeur de $\Phi PS2$ ont été enregistrées. Avec NaCl 40 et 80 g L⁻¹, l'IP et la croissance augmentent lorsque le niveau d'éclairement passe de E300 à E500.

Chez, *C. closterium*, l'effet du NaCl est plus marqué. En effet, la densité cellulaire maximale en présence de NaCl 140 g L⁻¹ est très faible sous E300 et les cellules ne prolifèrent pas sous E500 et E1000. A cette salinité, une faible IP sous E300 et une inhibition totale sous E500 et E1000 ont été mesurées. La valeur de $\Phi PS2$ est faible sous E300 et incalculable sous E500 et E1000.

Chez *P. versicolor*, la teneur en Chl *a* est affectée par la salinité croissante, ce qui explique la faible IP mesurée en présence de NaCl 140 g L⁻¹ aux différents éclairagements. Par contre, le rendement quantique effectif $\Phi PS2$ augmente avec la salinité.

En conclusion, *D. salina*, présente une activité photosynthétique (1000 $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1}$ Chl *a* h⁻¹ à 40 g L⁻¹, E500) et une croissance (2,8 10⁶ cellules mL⁻¹ à 40 g L⁻¹, E500) élevées par rapport à celles enregistrées chez *P. versicolor* (552 $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1}$ Chl *a* h⁻¹ ; 0,61 $\mu\text{g m L}^{-1}$ à 40 g L⁻¹, E300) et *C. closterium* (427 $\mu\text{mol O}_2 \text{ mg}^{-1}$ Chl *a* h⁻¹ ; 2,8 10⁶ cellules mL⁻¹ à 40 g L⁻¹, E500).

Certes, la croissance des trois espèces est influencée par l'ajout de NaCl et le niveau d'éclairement, mais la Chlorophycée et la cyanobactérie sont moins affectées par rapport à la diatomée qui subit une inhibition totale de croissance avec NaCl 140 g L⁻¹.

Nos résultats expérimentaux sont en accord avec la répartition des trois espèces dans leur milieu naturel. En effet, *D. salina* est l'espèce dominante dans le bassin de salinité très élevée (99 % de Chlorophycées majoritairement composées de *D. salina* dans le bassin TS de salinité moyenne 300). *P. versicolor* coexiste avec *D. salina* dans les bassins de salinité relativement élevée (64 % de Chlorophycées dont *D. salina* et 24 % de cyanophycées y compris *P. versicolor* sont signalés dans le bassin M2 de salinité moyenne 200), alors que *C. closterium* prolifère dans les bassins moins salés (37 % du phytoplancton sont des diatomées dont *C. closterium* recensés dans le bassin C21 de salinité moyenne égale à 90) (Abid, 2009).

Les organismes aérobies disposent de divers mécanismes enzymatiques et non enzymatiques pour éliminer les formes réactives de l'oxygène (ROS) (Gaber et al., 2004) qui sont produites en grande quantité dans des conditions de stress comme le froid, la salinité et la sécheresse, combiné à un éclairage élevé (Mittler, 2002; Fernandez et al., 2008).

A notre connaissance, très peu d'études se sont intéressées à l'impact de la salinité sur la production de ROS et la régulation du système de défense antioxydant chez les micro-algues (Tammam et al., 2011). Rijstenbil (2003 ; 2005) a montré que le stress salin (60 PSU) stimule la production de ROS chez la diatomée *C. closterium*, quel que soit le régime lumineux, en mesurant une augmentation de l'activité SOD qui atteint 400 U.E. mg^{-1} protéines et de l'activité APX qui atteint 35 U.E. mg^{-1} protéines. Ces valeurs sont nettement plus élevées (facteur 20 et 17, respectivement) que celles que nous avons obtenues pour cette espèce dans nos conditions expérimentales les plus contraignantes, à savoir 140 g L^{-1} de NaCl et E1000. Une telle différence pourrait être due aux souches différentes utilisées, celle que nous avons isolé de la saline de Sfax, présente peut être un système antioxydant non enzymatique particulièrement actif et/ou un système d'exclusion du sel performant et/ou un système photoprotecteur très efficace. Toutefois, les niveaux d'activité SOD et APX, que nous avons obtenus, sont comparables à ceux obtenus préalablement au laboratoire chez d'autres diatomées soumises à un excès de cuivre ou de zinc (Nguyen-Deroche, 2008).

Le stress salin et les UV induisent la formation de radicaux libres au niveau du PSI par la réaction de Mehler (Rijstenbil, 2005). Les ROS entravent le fonctionnement du cycle des xanthophylles. Par conséquent, une partie du flux d'électrons va réagir avec O_2 et générer des ions super-oxydes ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Le stress oxydant, induit par l'augmentation de la salinité comme par les rayons UV, pourrait aussi provenir de l'activation d'une NADPH oxydase, notamment dans les mitochondries (Rijstenbil, 2005). Les ROS engendrent la peroxydation des lipides, ce qui augmente la perméabilité des membranes et l'activité de phospholipases (Rijstenbil, 2005).

Nos résultats montrent que l'augmentation de la salinité déclenche l'activation des trois enzymes anti-oxydantes étudiées chez les trois espèces phytoplanctoniques, à l'exception de l'APX chez la cyanobactérie. De même, l'activité de cette dernière enzyme n'avait pas été détectée chez *Cyanobium bacillare* par Nguyen-Deroche (2008). Les travaux de Sung et al. (2008) mettent en évidence, qu'après 12 h d'exposition à 90 g L^{-1} de NaCl, l'activité enzymatique de la CAT, Fe-SOD, Mn-SOD, glutathion réductase (GR) et APX chez la macroalgue *Ulva fasciata* est stimulée. De même, chez la fougère aquatique *Azola pinnata* vivant en symbiose avec la cyanobactérie *Anabaena azollae*, l'activité de la SOD augmente de 12 à 80 % après addition de NaCl de 10 à 40 mM (Masood et al., 2006).

Selon Qiu et al. (2003), la SOD est une composante importante du processus de défense contre le stress oxydatif au cours d'une période de dessiccation chez *Nostoc*

flagelliforme, tandis que l'APX n'a pas d'activité détectable. Chez *P. versicolor*, l'activité SOD est élevée mais l'activité APX est absente.

Murik et Kaplan (2009) ont constaté une forte activité anti-oxydante, précédant la mort cellulaire chez *Chlamydomonas reinhardtii* et *Peridinium gatunense*. Ces auteurs ont supposé que l'activité anti-oxydante élevée ou un des métabolites générés par le stress, déclenche la cascade de la mort cellulaire (Murik et Kaplan, 2009). Nos résultats montrent une corrélation entre l'inhibition de la croissance de *C. closterium* aux éclairagements E500 et E1000 en présence de 140 g L⁻¹ de NaCl et une forte élévation de l'activité SOD, CAT et APX. Ces facteurs abiotiques sont donc stressants pour la diatomée.

Haghjoui et al. (2009) ont montré que l'application conjointe d'une forte intensité lumineuse (1200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et d'une faible température (13 °C) induit une augmentation des activités APX et SOD chez deux souches de *D. salina*. Dans notre étude, le stress oxydant augmente avec le niveau d'éclairement et la salinité chez *D. salina*, les activités SOD et APX augmentent ainsi que le taux des caroténoïdes qui sont des anti-oxydants non enzymatiques, moyen de défense privilégié contre les ROS (Bhandari et Shatma, 2006) surtout chez *D. salina* (Lers et al., 1990; Salguero et al., 2003; Tammam et al., 2011).

Chapitre V : Etude comparative entre *Dunaliella salina* et des micro-algues d'intérêt commercial

1. Résultats

1.1. La croissance

La croissance de *C. vulgaris*, *Nannochloropsis* sp. et *I. galbana* a été suivie pendant 11 jours sous deux régimes photopériodiques. Les courbes ainsi que les paramètres de croissance des micro-algues ont été établies à partir de dénombrement cellulaire (Tableau 14, Fig. 57).

C. vulgaris, *Nannochloropsis* sp. et *I. galbana* croissent plus rapidement et la densité cellulaire maximale est plus élevée sous un éclairage continu (24h) que sous un régime photopériodique 12 h: 12 h (lumière/obscurité, L/O). La densité cellulaire la plus élevée atteint $21,35 \pm 0,92 \cdot 10^6$ cellules mL^{-1} chez *Nannochloropsis* sp. le neuvième jour de croissance. A l'inverse, la croissance et la densité de *D. salina* sont significativement plus élevées sous le régime photopériodique qu'en lumière continue (Tableau 14, Fig. 57). Le taux de croissance (μ) des micro-algues, sous lumière continue, est plus élevé que celui enregistré sous le régime photopériodique 12L: 12O, sauf chez *D. salina* (Tableau 14).

Les différentes phases de croissance (latence, exponentielle et stationnaire) sont plus ou moins délimitées (Fig. 57). *Nannochloropsis* sp., *D. salina*, et *I. galbana* présentent une courte phase de latence, lorsque les cultures sont soumises à un régime photopériodique ; mais cette phase est absente lorsque ces micro-algues sont cultivées en lumière continue (Fig. 57). La phase de latence est également absente chez *C. vulgaris* cultivée sous les deux régimes lumineux. La phase exponentielle de croissance est observée chez toutes les micro-algues mais sa durée change en fonction de l'espèce et du régime lumineux. Quel que soit le régime lumineux, la phase stationnaire est atteinte avant le 10^{ème} jour de culture (Fig. 57).

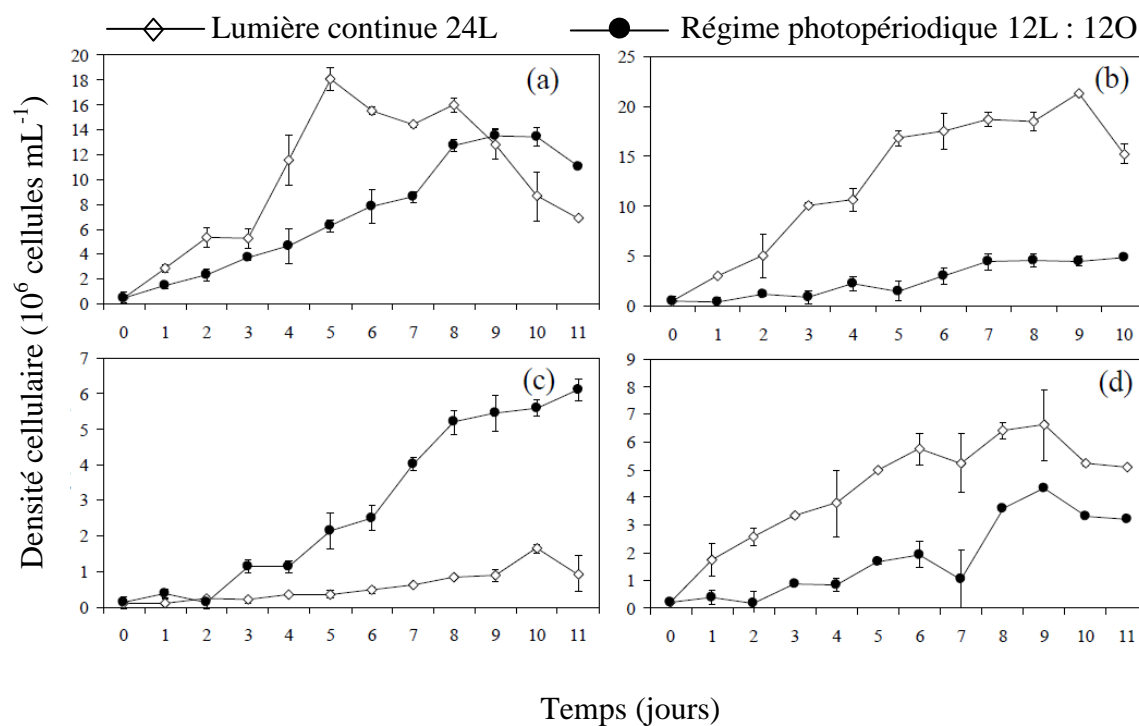


Figure 57. Courbes de croissance de *Chlorella vulgaris* (a), *Nannochloropsis* sp. (b), *Dunaliella salina* (c), et de *Isochrysis galbana* (d) cultivées dans le milieu Walnes modifié (1990) sous $27 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et en lumière continue (24L) ou un régime photopériodique (12L: 12O). Moyenne \pm SD (n=3).

Tableau 14. Taux de croissance (μ), densité cellulaire maximale et concentrations en métabolites (protéines : P, glucides : S et lipides : L) chez *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella salina* et *Isochrysis galbana* cultivées sous 27 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et en lumière continue (24L) ou un régime photopériodique (12L: 12O). Moyenne \pm E S (n=3). La même lettre signifie qu'il n'y a pas de différence entre les deux régimes lumineux (P : 0,05%) pour une même espèce. (*) P <0,05; (**) p <0,01; (***) p <0,001 : différence significative à 0,05; 0,01 et 0,001 (Test de Student). nd : non détecté.

espèce	<i>Chlorella vulgaris</i>			<i>Nannochloropsis</i> sp			<i>Dunaliella salina</i>			<i>Isochrysis galbana</i>		
	24L	12L:	(t)	24L	12L:	(t)	24L	12L:	(t)	24L	12L:	(t)
		12O	(df)		12O	(df)		12O	(df)		12O	(df)
μ (J^{-1})	2,63	2,5	0,01	2,55	1,6	2,94	0,7	1,9	1,28	1,6	0,8	1,63
	$\pm 0,22a$	$\pm 0,30a$	(4)	$\pm 0,10$	$\pm 0,15$	(4)*	$\pm 0,15$	$\pm 0,2$	(4)**	$\pm 0,10$	$\pm 0,17$	(4)
Densité maximale ($10^6 \text{cellules ml}^{-1}$)	18,05	13,50	1,42	18,71	4,80	5,38	1,65	6,10	3,31	5,74	4,34	4,18
	$\pm 2,05a$	$\pm 0,50a$	(20)	$\pm 1,82$	$\pm 0,50$	(18)***	$\pm 0,12$	$\pm 0,30$	(22)**	$\pm 0,05$	$\pm 0,70$	(20)***
Chl <i>a</i> ($10^{-3} \text{pg cellules}^{-1}$)	0,16	0,20	0,68	0,19	0,10	1,41	7,82	0,12	2,94	0,66	0,52	2,94
	$\pm 0,02a$	$\pm 0,01a$	(4)	$\pm 0,10$	$\pm 0,01$	(4)	$\pm 4,52$	$\pm 0,16$	(4)*	$\pm 0,52$	$\pm 0,02$	(4)*
Carotenoides ($10^{-3} \text{pg cellules}^{-1}$)	0,02	0,03	1,84	0,13	n.d	n.d	0,27	n.d	n.d	1,12	0,48	5,18
	$\pm 0,01a$	$\pm 0,01a$	(4)	$\pm 0,02$			$\pm 0,11$			$\pm 0,08$	$\pm 0,21$	(4)**
Proteines (pg cellules^{-1})	4,80	6,20	0,28	2,00	2,50	0,04	10,60	2,30	2,36	6,50	9,00	0,02
	$\pm 1,00a$	$\pm 1,20a$	(4)	$\pm 0,85$	$\pm 0,05$	(4)	$\pm 2,12$	$\pm 0,15$	(4)	$\pm 1,00$	$\pm 1,12$	(4)
Sucres	2,70	5,60	0,07	0,48	1,20	1,02	2,33	0,50	1,39	19,30	21,00	1,95
	$\pm 1,03a$	$\pm 2,00a$	(4)	$\pm 0,17$	$\pm 0,21$	(4)	$\pm 1,00$	$\pm 0,43$	(4)	$\pm 2,40$	$\pm 5,16$	(4)
Lipides	1,80	4,60	0,09	1,00	1,60	0,84	15,00	8,25	1,54	15,27	22,00	1,95
	$\pm 0,05a$	$\pm 1,21a$	(4)	$\pm 0,40$	$\pm 0,02$	(4)	$\pm 2,21$	$\pm 1,20$	(4)	$\pm 3,15$	$\pm 6,32$	(4)
Energie (nJ cellules^{-1})	207,75	207,33	0,00	44,06	64,79	0,57	757,93	345,13	15,00	743,25	862,97	0,36
	$\pm 145,4a$	$\pm 154,1a$	(4)	$\pm 31,89$	$\pm 54,23$	(4)	$\pm 43,38$	$\pm 19,80$	(4)***	$\pm 339,7$	$\pm 457,9$	(4)
production (mg L^{-1})	167,86	208,44	1,65	27,13	23,85	0,51	23,40	61,88	4,77	271,88	186,68	3,67
	$\pm 1,12a$	$\pm 0,96b$	(4)*	$\pm 2,10$	$\pm 1,78$	(4)	$\pm 1,04$	$\pm 1,60$	(4)***	$\pm 2,32$	$\pm 2,87$	(4)**

1.2. Les composés biochimiques

Les cellules de *C. vulgaris* renferment les même concentrations en Chl *a*, quelque soit le régime lumineux. La lumière continue favorise la synthèse de la Chl *a* chez les trois autres espèces. *D. salina* enregistre la plus forte concentration de Chl *a* en lumière continue (Tableau 14).

Les concentrations en caroténoïdes chez *Nannochloropsis* sp., *D. salina* et *I. galbana* sont élevés en lumière continue par rapport a celles enregistrées en régime photopériodique. *Nannochloropsis* sp. et *D. salina* sont incapables de synthétiser des caroténoïdes en régime photopériodique (12L: 12D).

Les concentrations en protéines, glucides solubles et lipides montrent des tendances similaires chez *C. vulgaris*, *Nannochloropsis* sp., et *I. galbana*. Ces concentrations augmentent au cours de la croissance et les valeurs en glucides et en lipides les plus élevées sont enregistrées en phase stationnaire (jour 8 ou 9) sous les deux régimes lumineux (Fig. 58).

Chez *D. salina*, les lipides augmentent durant la croissance, quel que soit le régime lumineux ; tandis que les teneurs en protéines et en sucres diminuent (Fig. 58). *Nannochloropsis* sp. enregistre la plus forte concentration en protéines (57,44 % du totaux lipides, protéines et sucres), suivie par *C. vulgaris* (51,60 %) quand elle est cultivée en lumière continue (Fig. 58, Tableau 14). *I. galbana* renferme la plus grande concentration en glucides solubles (47 % du total P, S et L). Chez *C. vulgaris*, les sucres représentent 29 et 34 % en lumière continue (24L) et régime photopériodique (12L: 12O) respectivement. Quelle que soit l'espèce ou le régime lumineux, les lipides augmentent au cours de la croissance des différentes micro-algues. Les concentrations en lipides sont élevées chez *D. salina*, elles atteignent 53,7 et 74,6 % du total P, S et L en lumière continue et sous régime photopériodique, respectivement. Les espèces étudiées synthétisent plus de lipides lorsqu'elles sont cultivées en régime photopériodique que sous lumière continue à l'exception de *D. salina* (Fig. 58, Tableau 14).

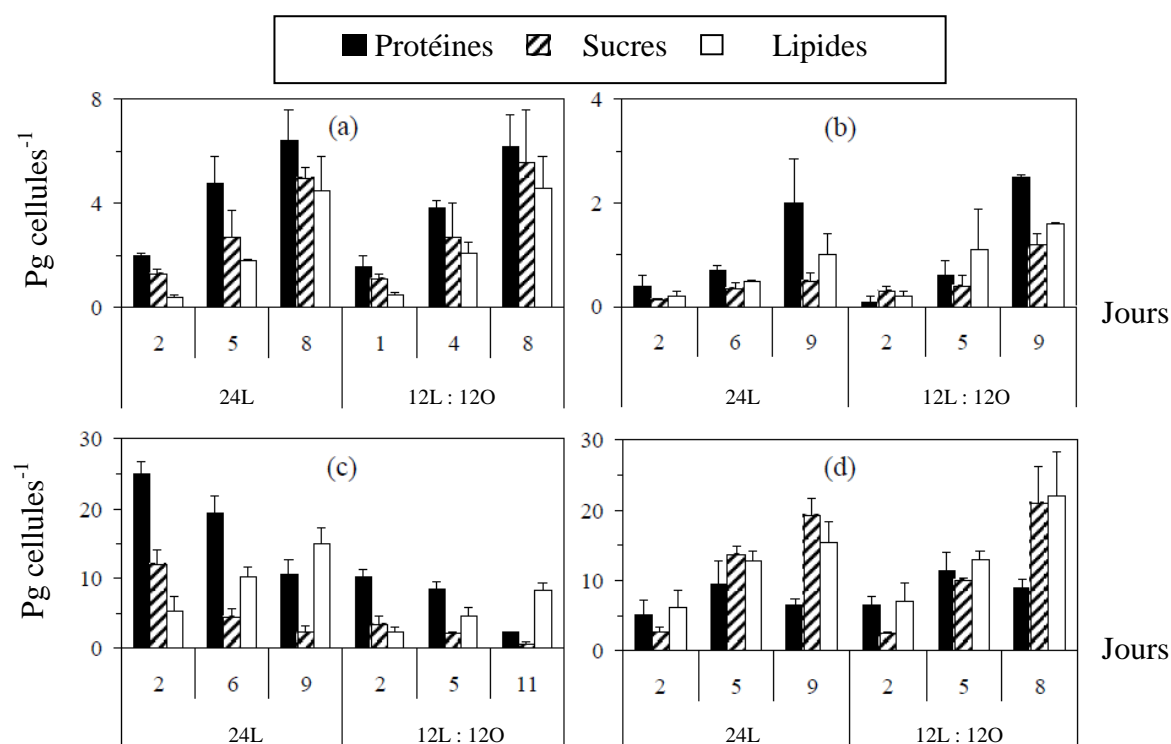


Figure 58. Concentrations en protéines, glucides solubles et lipides (pg cellule⁻¹) chez *Chlorella vulgaris* (a), *Nannochloropsis* sp. (b), *Dunaliella salina* (c), et de *Isochrysis galbana* (d) cultivées sous 27 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en lumière continue (24L) et sous régime photopériodique 12 h de lumière / 12 h d'obscurité (12L: 12O). Les jours où les cellules ont été récoltées sont indiqués sur l'axe horizontal. Moyens \pm SD (n = 3).

1.3. Les acides gras

La composition en acides gras (AGS) chez les quatre espèces de micro-algues, cultivées sous les deux régimes lumineux, a été analysée à la fin de la phase exponentielle (Tableau 15). Les proportions en acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI), et polyinsaturés (AGPI) sont différentes chez les quatre espèces. La teneur en AGS ne diffère pas de façon significative ($P = 0,05$) entre les deux régimes lumineux chez les quatre micro-algues (Tableau 15). La proportion des AGS diminue de 35,9 à 23,9 % chez *D. salina* et de 20,2 à 17,6 % du total des acides gras chez *Nannochloropsis* sp. cultivées sous 12L: 12O. Le régime lumineux ne modifie pas la proportion des AGS chez *C. vulgaris* et *I. galbana* (Tableau 15). Les AGS sont majoritairement acides 16 : 0 et 18 : 0 chez *C. vulgaris* et *D. salina* et les acides 14 : 0 et 16 : 0 chez *I. galbana* et *Nannochloropsis* sp. Les AGMI sont surtout les acides gras 16 : 1 (n-7) et 18 : 1 (n-9) chez *C. vulgaris* et *I. galbana*, 14 : 1 (n-5) et

18: 1 (n-9) chez *D. salina* et 16 : 1 (n-9) et 16: 1 (n-7) chez *Nannochloropsis* sp. (Tableau 15). La proportion des AGMI est légèrement plus élevée quand les micro-algues sont cultivées en régime jour/nuit (12L: 12O). *D. salina* est une source importante en acide tétradécénoïque 14 : 1 (n-5), qui atteint $9,6 \pm 1,1$ % et $10,2 \pm 1,0$ % lorsqu'elle est cultivée en lumière continue et 12L: 12O, respectivement. *Nannochloropsis* sp. est riche (25 %) en acide hexadécanoïque 16: 1 (n-9) quel que soit le régime lumineux. L'acide gras 16 : 1 (n-7) atteint 18 % chez *I. galbana* lorsque les cellules sont cultivées sous 12L: 12O. L'acide 18 : 1 (n-9) représente 15 % des AGS chez *D. salina* quel que soit le régime lumineux. Le principal AGPI est différent pour chaque espèce de micro-algue : *C. vulgaris* est riche en 18 : 3 (n-3), *D. salina* en 16 : 4 (n-3), *I. galbana* est riche en acide docosahexaénoïque 22 : 6 (n-3) (DHA) et *Nannochloropsis* sp. renferme de l'acide eicosapentaénoïque 20 : 5 (n-3) (EPA) (Tableau 15). Le régime lumineux n'a pas modifié la concentration en AGPI, sauf chez *D. salina* où la concentration est plus élevée (37,8 %) en régime photopériodique qu'en lumière continue (28,6 %). Toutefois, le test de Student ne révèle pas de différence significative entre des concentrations en AGPI entre les deux régimes lumineux ($p > 0,05$) (Tableau 15). De plus, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les acides gras (n-3) et (n-6) entre les deux régimes lumineux pour chaque espèce (Tableau 15). Le rapport (n-3) / (n-6) est supérieure à 1 pour les différentes espèces, et varie de 2,1 chez *D. salina* à 4,4 chez *I. galbana* (Tableau 15).

Tableau 15. Effet de lumière continue (24L) et photopériodique (12L: 12O) sur la composition des acides gras (% du total des acides gras) chez *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* sp., *Dunaliella salina* et *Isochrysis galbana* cultivées à $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, récoltées à la fin de la phase exponentielle de croissance. Moyens \pm S.D. (n = 3). Les acides gras représentant moins de 5% des acides gras totaux chez les quatre espèces ne sont pas mentionnés dans ce tableau, mais ils sont pris en compte dans la sommation du totale. Abréviations: EPA : acide eicosapentaénoïque, DHA: acide docosahexaénoïque, AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras mono-insaturés, AGPI : acides gras poly-insaturés. Pour chaque espèce, la même lettre signifie qu'il n'y a pas de différence entre les niveaux d'éclaircements (test de Student, 0,05%) ; Abréviations : Tr : traces ; - : non détecté

espèces	<i>Chlorella vulgaris</i>		<i>Dunaliella salina</i>		<i>Isochrysis galbana</i>		<i>Nannochloropsis</i> sp	
Acides gras	24L	12L:12O	24L	12L:12O	24L	12L:12O	24L	12L:12O
14:00	2,2 \pm 0,6	2,0 \pm 0,3	2,8 \pm 1,2	1,7 \pm 0,5	6,1 \pm 1,4	6,4 \pm 2,3	4,3 \pm 0,5	4,0 \pm 0,1
16:00	17,0 \pm 1,2	18,0 \pm 1,9	21,8 \pm 3,5	15,5 \pm 2,9	13,6 \pm 2,1	14,0 \pm 3,3	15,5 \pm 1,2	13,4 \pm 0,7
18:00	3,1 \pm 0,1	3,0 \pm 0,2	9,5 \pm 1,0	5,3 \pm 1,5	1,7 \pm 0,6	2,0 \pm 0,7	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0
Σ ASS	24,3a	25,8a	35,9b	23,9b	23,0c	24,4c	20,2d	17,6d
14:01 (n-5)	0,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	9,6 \pm 1,1	10,2 \pm 1,0	0,5 \pm 0,0	0,8 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	0,8 \pm 0,3
16:01 (n-9)	1,6 \pm 1,2	2,1 \pm 0,7	2,1 \pm 0,3	2,5 \pm 0,1	tr	0,1 \pm 0,1	24,7 \pm 0,1	25,2 \pm 1,5
16:01 (n-7)	7,1 \pm 1,8	7,5 \pm 0,5	2,2 \pm 1,2	3,3 \pm 0,5	2,0 \pm 1,0	2,2 \pm 0,5	17,2 \pm 2,2	18 \pm 1,5
18:01 (n-9)	4,2 \pm 1,1	6,1 \pm 0,8	14,9 \pm 1,2	15,0 \pm 0,8	9,5 \pm 2,3	9,8 \pm 1,2	3,3 \pm 1,1	3,6 \pm 0,8
18:01 (n-7)	2,3 \pm 1,0	3,2 \pm 0,6	4,8 \pm 1,3	5,1 \pm 1,1	0,7 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	2,0 \pm 0,2	2,3 \pm 0,5
Σ MUFAS	16,7a	20,7a	34,1b	37,1b	13,1c	14,6c	47,8d	50,6d
16:02 (n-3)	13,0 \pm 1,8	11,5 \pm 0,8	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,0	-	0,1 \pm 0,1	-	tr
16:04 (n-3)	-	-	14,0 \pm 2,3	15,0 \pm 1,2	0,7 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	-	0,1 \pm 0,1
18:02 (n-6)	11,0 \pm 2	10,5 \pm 1,5	0,9 \pm 0,2	1,2 \pm 0,4	2,9 \pm 1,1	3,2 \pm 0,8	4,9 \pm 1,1	5,2 \pm 1,5
18:03 (n-3)	21,6 \pm 3,2	22,0 \pm 3,0	0,8 \pm 0,3	1,1 \pm 0,2	6,0 \pm 1,2	6,3 \pm 0,9	0,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
18:04 (n-3)	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	0,6 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	14,5 \pm 1,3	14,8 \pm 2,1	tr	0,3 \pm 0,1
20:5 (n-3) EPA	1,2 \pm 0,3	1,9 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2	0,5 \pm 0,2	1,1 \pm 0,3	19,8 \pm 2,0	20,4 \pm 1,8
22:6 (n-3) DHA	-	-	4,3 \pm 1,3	6,5 \pm 1,8	21,0 \pm 0,5	21,5 \pm 0,6	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1
Σ (n-6)	16,7a	15,0a	7,6b	11,6b	10,6c	11,8c	6,1d	7,9d
Σ (n-3)	36,3a	35,9a	20,4b	24,7b	46,4c	49,5c	22d	24d
Σ PUFAs	54,3a	52,3a	28,6b	37,8b	59,0c	62,1c	28,1d	32,1d
(n-3)/(n-6)	2,2	2,4	2,7	2,1	4,4	4,2	3,6	3

1.4. Energie et productivité des micro-algues

L'énergie emmagasinée dans les protéines, glucides solubles et les lipides varie sensiblement de $345,13 \pm 19,80 \text{ nJ cellule}^{-1}$ à $757,93 \pm 43,38 \text{ nJ cellule}^{-1}$ chez *D. salina* lorsque les cellules sont cultivées avec l'alternance jour/nuit et en lumière continue, respectivement. Statistiquement, le régime lumineux n'a pas d'effet significatif sur l'énergie

accumulée dans ces trois types de métabolites chez les trois autres espèces ($P > 0,05$) (Tableau 14).

2. Discussion

Cette étude montre que la croissance des quatre micro-algues dépend du régime lumineux appliqué. Contrairement à d'autre espèce halophile, *D. salina* montre une croissance optimale, lorsqu'elle est cultivée en régime photopériodique (Fig. 56). Selon Grobbelaar (2010) et Vejrazka et al. (2011), le régime photopériodique peut améliorer l'efficacité photosynthétique des micro-algues. En outre, les micro-algues sont capables de s'acclimater à différentes conditions de lumière en modifiant leur appareil photosynthétique (Falkowski et LaRoche, 1991; Simionato et al., 2011). Dans notre étude, la lumière continue stimule la synthèse de Chl *a* et des caroténoïdes chez *D. salina* et *I. galbana* (Tableau 14). La densité cellulaire enregistrée chez *D. salina* est similaire à celle enregistrée chez *D. bardawil* cultivée à 30 °C, sous un éclairage de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ avec une photopériode de 16 h (Zeng et al., 2013). Nos résultats montrent que malgré le faible éclairage ($27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), une photopériode de 12 heures peut être suffisante pour stimuler la croissance de *D. salina*. Les taux de croissance des micro-algues marines et d'eau douce sont influencés par les facteurs abiotiques (température, niveau d'éclairage, régime lumineux), mais peuvent également varier en fonction de l'origine géographique des souches (Gómez et González, 2005; Yeessang et Cheirsilp, 2011).

Nos résultats montrent que *C. vulgaris*, *Nannochloropsis* sp., et *I. galbana* présentent des taux de croissance plus élevés en lumière continue qu'en alternance jour/nuit. *Nannochloropsis* sp. est largement utilisée comme source de nourriture pour les herbivores en éclosion (Tawfiq et al., 1999), atteint une densité maximale de $18,71 \pm 1,82 \cdot 10^6$ cellules mL^{-1} en lumière continue. Nos résultats corroborent avec ceux de Rocha et al. (2003) et Wahidin et al. (2013). Ces auteurs ont constaté que *Nannochloropsis gatitana* se développe plus vite en lumière continue qu'en régime photopériodique. Chez *I. galbana*, la densité cellulaire maximale atteint $6,62 \pm 0,29 \cdot 10^6$ cellules mL^{-1} alors qu'elle n'atteint que $2 \cdot 10^6$ cellules mL^{-1} lorsque cette espèce est éclairée par des diodes électroluminescentes (Yao et al., 2012). Le taux de croissance des micro-algues est très sensible aux conditions de culture, comme le niveau d'éclairage et la durée de la photopériode (Xue et al., 2011; Ho et al., 2013). Le niveau d'éclairage est un paramètre important pour assurer la croissance des micro-algues. Nos résultats montrent que l'éclairage de $27 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ est suffisant pour stimuler la croissance de *C. vulgaris*, *Nannochloropsis* sp., et *I. galbana*. Par ailleurs, Wahidin et al.

(2013) ont montré que *Nannochloropsis* sp. subit une photo-inhibition lorsque les cellules sont cultivées en lumière continue sous un éclairage de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La lumière contrôle également le cycle cellulaire en fournissant l'énergie nécessaire à la division cellulaire, mais peut aussi jouer le rôle d'un signal déclenchant la machinerie cellulaire (Claquin et al., 2002, Hagiwara et al., 2002, Kromkamp et Claquin, 2006). La phase sombre peut être nécessaire au bon déroulement du cycle cellulaire et de voies de biosynthèse chez *D. salina*.

La lumière continue favorise la synthèse de Chl *a* et des caroténoïdes chez *D. salina* sans que la croissance soit améliorée. La croissance optimale de *D. salina* est observée sous un régime photopériodique, mais elle ne synthétise pas de caroténoïdes dans cette condition. Habituellement, la synthèse de β -carotène est favorisée chez *D. salina* dans des conditions stressantes (Riahi et al., 2007; Guedes et al., 2011). *Nannochloropsis* sp. et *I. galbana* sont riches en caroténoïdes et leur croissance est favorisée en lumière continue.

Le régime lumineux, 24L ou 12L: 12D, n'a eu aucune incidence importante sur les teneurs en glucides solubles, protéines et lipides chez les quatre micro-algues. Cependant, la lumière continue induit un changement métabolique chez *D. salina*, ayant comme conséquence, l'accumulation des protéines et des lipides principalement. Chez les trois autres espèces, les concentrations en protéines, sucres solubles et lipides augmentent, lorsque les cellules sont cultivées en régime photopériodique. *C. vulgaris* et *Nannochloropsis* sp. accumulent plus de protéines que les sucres et les lipides, quel que soit le régime lumineux ; tandis que *I. galbana* accumule des glucides solubles et des lipides. Espinoza et al. (2002) montrent que les cellules d'*I. galbana* cultivées sous $72 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ renferment de faibles concentrations en glucides ($4,0 \text{ pg cellule}^{-1}$) et en lipides ($9,6 \text{ pg cellule}^{-1}$). Les teneurs en glucides solubles et en lipides chez *I. galbana* sont élevées dans notre étude. Les concentrations, élevées en métabolites chez *D. salina*, sont dues probablement à la taille des cellules ($5\text{-}20 \mu\text{m}$) qui est relativement grande. Toutefois, les tailles des cellules d'*I. galbana* ($3\text{-}5 \mu\text{m}$) et de *C. vulgaris* ($5 \mu\text{m}$) sont similaires, mais l'énergie correspondant aux protéines, glucides solubles et lipides chez *I. galbana* est 3 à 4 fois plus élevée que chez *C. vulgaris*. Stephenson et al. (2010) ont montré que l'augmentation de la taille cellulaire de *C. vulgaris* est due à une accumulation des lipides, lorsque l'azote devient limitant. Zhu et al. (1997) et Espinoza et al. (2002) ont noté que les réserves en lipides et en sucres ont tendance à s'accumuler au cours de la phase stationnaire chez certaines micro-algues comme *I. galbana*. Ces résultats corroborent avec ce que nous avons observé. En outre, Renaud et al. (1991) ont

mentionné que la concentration en protéines est toujours plus élevée au cours de la phase exponentielle de croissance de cette espèce. La meilleure production en protéines, en sucres et en lipides a été obtenue avec *I. galbana*, cultivée en lumière continue, suivie par *C. vulgaris* sous 12L: 12O. Ceci peut s'expliquer par les densités cellulaires élevées et par conséquent des quantités de métabolites élevées.

Cette étude montre que les proportions en acides gras saturés, mono-insaturés, et polyinsaturés diffèrent selon les espèces. En outre, le régime lumineux n'a pas d'effet significatif sur les proportions des différents acides gras comme les acides gras (n-6) et (n-3). *Nannochloropsis* sp est riche en AGMS (50,6 %) qui se composent principalement de 16:1 (n-9) qui représente 25 % du total des acides gras. *D. salina* est la seule espèce riche en acide myristoléique 14 : 1. Cette acide est actif dans la stimulation de la glycolyse chez l'homme (Duan et al., 1997). *C. vulgaris* est riche en acide linoléique (18:3 n-3) (environ 22 % du total des acides gras). Mendes et al. (1995) ont montré que *C. vulgaris* est pauvre en acide linoléique (9 % du total des acides gras). L'acide linoléique est un acide gras majeur chez les plantes, puisqu'il est un précurseur des acides gras n-3. Pereira et al. (2004) montrent que l'acide docosahexaénoïque (DHA) peut être synthétisé à partir de l'acide linoléique. D'autre part, *C. vulgaris* est riche (13 %) en 16 : 3 (n-3). Santiago-Vázquez et Jacobs (2005) ont mis en évidence que les micro-algues vertes synthétisent le DHA à partir du 18 : 3 (n-3). *I. galbana* présente la plus forte proportion en AGPI, l'acide docosahexaénoïque (DHA) est majoritaire (21%). Ce pourcentage est plus élevé par rapport au pourcentage enregistré chez *Pavlova lutheri*, qui est une micro-algue marine couramment utilisée en aquaculture et comme source d'AGPI (n-3). En effet, *Pavlova lutheri* renferme $12,6 \pm 0,2$ % de DHA du total des acides gras sous $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et 19 % sous $340 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Guihéneuf et al., 2009). Par ailleurs, *I. galbana* renferme la plus grande proportion en acide gras (n-3), entre 46,4 et 49,5 %. Cette proportion n'est pas affectée par le régime lumineux. Guihéneuf et al. (2009) indiquent que *Pavlova lutheri* est également riche (45 à 53%) en acides gras (n-3). *D. salina* renferme 6 % de DHA par rapport au total des acides gras sous régime photopériodique. *Nannochloropsis* sp. est riche en acide eicosapentaénoïque (EPA) qui représente 20 % des AGS. Il est à noter que cette espèce est pauvre en AGPI (environ 30 %). Pereira et al. (2004) estiment que la faible quantité en EPA chez *I. galbana* est due à la conversion d'une grande quantité de l'EPA en DHA. *Nannochloropsis* sp augmente sa concentration en acides gras de 15 à 45 % de la masse sèche totale lorsque le niveau d'éclairement augmente de 75 à 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Solovchenko et al., 2011). Dans

notre étude, la proportion de DHA et d'EPA augmente légèrement en régime photopériodique par rapport à l'éclairement continu chez les micro-algues. Les AGPI sont exploités dans le domaine pharmaceutique (Apt et Behrens, 1999; Ward et Singh, 2005). Ces acides gras sont également connus pour leur rôle majeur dans la prévention des troubles de la circulation sanguine (Dyerberg et Bang, 1979; Din et al., 2004; Mozaffarian et Wu, 2011), les maladies inflammatoires (Babcock et al., 2000) et les cancers (Bourre, 2007; Courtney et al., 2007). Le rapport (n-3) / (n-6) est plus élevé chez *I. galbana* et *Nannochloropsis* sp (entre 3 et 4) que chez *C. vulgaris* et *D. salina* (2 et 3), respectivement. Horrocks et Yeo (1999) indiquent que le rapport optimal entre (n-3) / (n-6) dans un régime alimentaire est d'environ 0,25. *Pavlova lutheri* et *Odontella aurita* enregistrent des rapports (n-3) / (n-6) atteignant 19,95 et 22,50 respectivement lorsque les cellules sont cultivées sous $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Guihéneuf et al., 2010). La plupart des acides gras polyinsaturés oméga-3 consommés par les êtres humains proviennent de poissons et d'autres produits de la mer, y compris le phytoplancton qui constituent la base des chaînes alimentaires marines (Kang, 2011).

En conclusion, les micro-algues étudiées pourraient être utilisées comme source d'AGPI (n-3) lorsque les cellules sont cultivées sous faible éclaircissement. Actuellement, les acides gras (n-6) constituent la classe dominante des acides gras insaturés couramment consommés. Certaines micro-algues sont déjà commercialisées comme complément alimentaire (par exemple *Odontella aurita*) afin d'augmenter le rapport (n-3) / (n-6) jusqu'à 0,10 qui est le taux recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Ce complément alimentaire joue un rôle préventif contre les maladies cardiovasculaires (Moreno et Mitjavila 2003), les cancers, le diabète et les maladies neuro-dégénératives (Simopoulos et Cleland, 2003). Plusieurs études suggèrent que l'augmentation du rapport n-3/n-6 est bénéfique pour la santé humaine (Horrocks et Yeo 1999; Goodstine et al., 2003).

DISCUSSION GENERALE



Quatrième Partie : Discussion générale

La saline de Sfax est un milieu artificiel qui attire de nombreux oiseaux qui se nourrissent du plancton qui y prolifère (Dolapsakis et al., 2005; Vos et de la Rosa, 1980). Cette attraction est due à différents paramètres qui caractérisent ce type de biotope (Dolapsakis et al., 2005; Oren, 2009; Nagasathya et Thajuddin, 2008; Debelius et al., 2009; Chatchawan et al., 2011; Madkour et Gaballah, 2012; Asencio, 2013). Le tableau ci-dessous récapitule ces caractéristiques:

Tableau 16. Principales caractéristiques de la saline de Sfax

Paramètres	caractéristiques
évaporation	stimulée
éléments nutritifs	concentrés
salinité	gradient croissant
pH	basique
dioxygène dissous	gradient décroissant
indice de diversité H'	gradient décroissant

La salinité est le facteur dominant. Celle-ci influence la diversité du phytoplancton. En effet les espèces ont pu être classées en fonction de leur tolérance au sel en espèces moyennement et extrêmement halotolérantes (DasSarma et Arora, 2001; Dolapsakis et al., 2005; Nagasathya et Thajuddin, 2008). Le niveau de tolérance dépend des mécanismes d'adaptation ou d'acclimatation des espèces au sel, comme l'expulsion du sodium via des transporteurs d'ions (Rai et Gaur, 2001). Dans notre étude, nous avons recherché le gène codant l'antiport SOS1 chez les trois espèces isolées : *D. salina*, *C. closterium* et *P. versicolor*. Cet antiport Na^+/H^+ a été mis en évidence chez la plante terrestre *Arabidopsis thaliana* et la macro-algue *Ectocarpus siliculosus* (Banque de données). Nos résultats infructueux nous laissent supposer que l'antiport SOS1 est inexistant chez les micro-algues et la cyanobactérie que nous avons récoltées. Il est fort probable qu'il existe d'autre antiport qui

assure l'homéostasie jouant le même rôle que l'antiport SOS1 identifiés chez des plantes comme *Arabidopsis* et les gènes NhaP bactériens codant des antiports Na^+/H^+ identifié chez *Synechocystis* sp. PCC 6803 et *Pseudomonas aeruginosa* (Hamada et al., 2001). Des recherches plus approfondies *in silico* doivent être effectuées

Le niveau des paramètres mesurés chez les trois espèces cultivées au laboratoire (la croissance, le profil pigmentaire, l'activité photosynthétique et l'activité anti-oxydante) dépend de la tolérance au sel de chaque espèce. En premier lieu, nous enregistrerons une diminution de la croissance plus ou moins marquée en fonction de l'espèce et de la salinité, la croissance de *D. salina* et *P. versicolor* est moins affectée par la salinité que celle de la diatomée *C. closterium*. Selon Chen et Jiang (2009), la capacité d'adaptation de *D. salina* est due à la plasticité de sa membrane plasmique. En revanche, l'ajout de sel déminéralise le frustule chez les diatomées et diminue la teneur en silice qu'il renferme (Saros et Fritz, 2000), ce qui pourrait rendre *C. closterium* plus vulnérable.

La synthèse de pigments caroténoïdes est un mécanisme d'adaptation important chez les photo-autotrophes dans des conditions de stress, comme une concentration élevée en sel et un fort éclaircissement. Cette synthèse accrue a surtout été observée chez *D. salina* (Ben-Amotz et Avron, 1983; Pisal et Lele, 2005; Salguero et al., 2003, Hu et al., 2014). Les caroténoïdes sont capables de dissiper l'énergie lumineuse efficacement en stabilisant le O_2 singulet et les radicaux peroxydes générés en conditions stressantes (Wang et al., 2010). Selon Sultana et al. (1999), les caroténoïdes jouent un rôle important dans l'adaptation au sel, en permettant le changement de la conformation des antennes (LHCII) lors de la dissipation thermique. La synthèse des autres pigments (Chl *a* et Chl *b*) est également stimulée sous l'effet de l'éclaircissement chez *D. salina*, permettant de maintenir une activité photosynthétique suffisante pour la synthèse de glycérol (Liska et al., 2004). Les teneurs en Chl *a* et Chl *c* chez *C. closterium* augmentent aussi, mais seulement jusqu'à un certain niveau de stress salin et lumineux, puisque sous E500 et E1000 en présence de NaCl 140 g L^{-1} , les cellules meurent. Lorsque l'intensité de l'éclaircissement dépasse la capacité de l'appareil photosynthétique, la chaîne de transport des électrons est saturée générant des ROS qui désorganisent l'appareil photosynthétique, en particulier le PSII. Ces ROS peuvent causer le photo-blanchiment (destruction des molécules de chlorophylle), des dommages à la membrane thylacoïdale et même la mort cellulaire (Stadnichuck et al., 2013). Schubert et al. (1993) ont observé une diminution de la teneur en pigments photosynthétiques (Chl *a* et phycocyanine) chez *Synechocystis* PCC6803 suite à l'ajout de NaCl . Les pigments, assurant la photosynthèse, sont

moins efficaces en condition optimale (NaCl 342 mM) qu'en condition stressante (NaCl 1026 mM), car les cellules moins riches en pigments absorbent la lumière plus efficacement. Les spectres d'émission de fluorescence révèlent de l'énergie inefficace transférée entre le phycobilisome et la Chl *a* lorsque les cellules sont riches en pigments. Hu et al. (2014) constatent une diminution des teneurs en Chl *a* et en phycocyanine chez *Scytonema javanicum* en présence de NaCl 0,085 mM, mais les teneurs en caroténoïdes augmentent. Dans notre travail, la teneur en caroténoïdes demeure inchangée chez *P. versicolor*. Selon Bolay et al. (2008), les différentes espèces de cyanobactéries ne développent pas les mêmes stratégies afin de survivre dans des conditions de stress.

La photosynthèse présente globalement une diminution en présence d'une salinité croissante chez les micro-algues (Hu et al., 2014). Ceci est dû probablement à une diminution de l'activité du PSII (Kirst, 1990, Hu et al., 2014) qui est associée à une inhibition du transport des électrons (Hu et al., 2014) entre QA et QB (le premier et le deuxième accepteur d'électron au niveau du PSII) et un réajustement de la distribution des électrons entre le PSI et le PSII (Stade 2 de transition; Lu et Zhang, 1999). Par contre, l'IP est stimulée par l'augmentation du niveau d'éclairement (Melis et al., 1999; Neidhardt et al., 1998; Vonshak et Guy, 1988).

Le rendement quantique maximal (F_v/F_m) présente une valeur stable, d'environ 0,7 chez les deux micro-algues, la valeur mesurée chez *P. versicolor* est plus faible (environ 0,55), elle résulte de la dissociation des phycobilisomes sous l'effet du flash lumineux (Boulay et al., 2008). Le rapport F_v/F_m est l'indicateur le plus fréquemment utilisé pour évaluer l'état physiologique du PSII (Krause et Weis, 1991).

Le mécanisme de photo-inhibition est déclenché par plusieurs paramètres environnementaux (Murata et al., 2007) qui agissent directement sur le PSII et génèrent des ROS qui inhibent la réparation des PSII endommagés. La lumière en synergie avec le sel modifie les mécanismes d'adaptation chez les micro-algues et les cyanobactéries (Neale et Melis, 1989; Lu et Zhang, 1999 ; Allakhverdiev et al., 2002 ; Allakhverdiev et Murata, 2004; Mutra et al., 2007). Notre étude montre que le niveau d'éclairement modifie la tolérance des 3 espèces au stress salin.

Les organismes photosynthétiques, comme les micro-algues et les cyanobactéries, développent plusieurs mécanismes moléculaires conduisant à l'optimisation de la photochimie et à la protection contre l'excès de lumière. Les deux processus dominant et rapidement déclenchés sont l'état transitoire de la distribution de l'énergie lumineuse entre les deux

photosystèmes et la dissipation thermique non photochimique (NPQ). Ces deux processus protègent l'appareil photosynthétique contre les dommages causés par l'excès de lumière (Stadnichuk et al., 2013). La dissipation d'énergie sous forme de chaleur est un mécanisme largement répandu chez les photo-autotrophes (Boulay et al., 2008). Nous avons obtenu des valeurs de NPQ de plus en plus élevées chez les trois espèces lorsque la salinité et l'éclairement augmentaient. *C. closterium* est l'espèce ayant l'appareil photosynthétique le plus affecté, puisque NPQ atteint la valeur de 21 (NaCl 80 g L⁻¹ et E 1000). La dissipation de l'excès d'énergie s'effectue graduellement en trois étapes : stade de transition (redistribution de l'énergie absorbée entre PSI et PSII), la dissipation thermique sous forme de chaleur et enfin l'inactivation irréversible et la dégradation de la protéine D1 du PSII par les ROS (photo-inhibition) (Bissati et al., 2000). Une photo-inhibition a été observée chez *C. closterium*.

Les variations de NPQ observées donnent une indication sur l'apparition des processus de dissipation de l'énergie excédentaire, grâce aux couples violaxanthine-zéaxanthine chez la Chlorophycée (Perrine et al., 2012) et diatoxanthine-diadinoxanthine chez la diatomée (Nymark et al., 2009), lorsque les cellules sont soumises aux contraintes du milieu. La cyanobactérie dissipe l'énergie en excès sous forme de chaleur via ses antennes riches en phycobiliprotéines (PB) et en Orange Caroténoïde Protéine (OCP) (Boulay et al., 2008). Selon ces auteurs, le complexe (OCP-PB) protège la majorité des cyanobactéries contre les intensités lumineuses élevées en déclenchant le mécanisme de dissipation thermique. Certaines espèces, dépourvues d'OCP, possèdent d'autres mécanismes physiologiques comme la diminution de la taille des phycobilisomes, afin de surmonter les conditions stressantes. Les caroténoïdes de *P. versicolor* participent probablement à la dissipation de l'énergie en excès, maintenant ainsi une activité normale des centres réactionnels (Boulay et al., 2008) qui se traduit par des valeurs élevées du Φ_{PS2} . Malgré les teneurs faibles en pigments, le transfert d'énergie des antennes réceptrices jusqu'aux photosystèmes reste élevé. La régulation du contenu pigmentaire en fonction de la salinité permet une utilisation plus efficace de l'énergie lumineuse comme l'ont signalé Schubert et al. (1993).

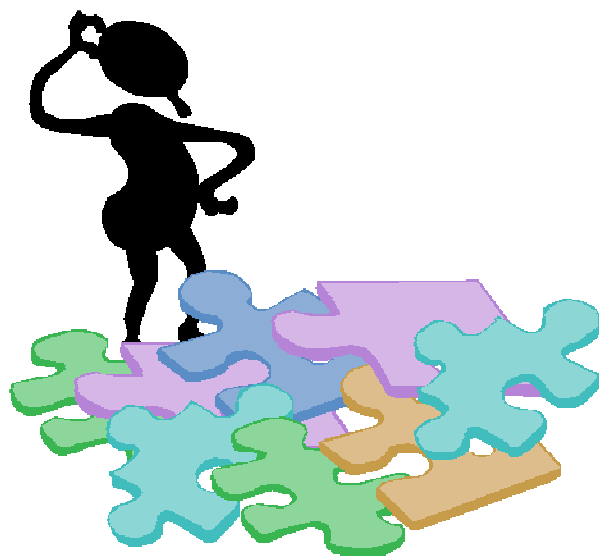
Plusieurs études ont porté sur la saline de Sfax depuis une dizaine d'années. Des analyses en composantes principales ont mis en évidence les interactions existant entre les paramètres physico-chimiques et le plancton (Ayadi et al., 2002, 2004; Elloumi et al., 2009; Abid et al., 2008; Khemakhem et al., 2010; Kobbi-Rebai et al., 2013). Cependant, cette analyse combine les processus physiques et biologiques entre eux, et en général montre des

schémas complexes de variation. Pour cette raison, des analyses plus structurées comme STATICO (Thioulouse et al., 2004) pourraient être utiles et particulièrement adaptées pour étudier les relations stables entre l'abondance des espèces et les paramètres environnementaux, lorsque les deux varient au cours du temps. Nous avons donc utilisé le logiciel STATICO qui confirme que le sel est le principal facteur de structuration des communautés phyto-planctoniques. La grande majorité des espèces se trouve principalement dans les bassins les moins salés. Ces bassins abritent des espèces de diatomées et des Dinophycées et rarement des Euglenophycées. Les bassins les plus salés contiennent quelques Chlorophycées, en particulier *D. salina*, et des Cyanophycées comme *Aphanothece* sp., *P.versicolor* et *Oscillatoria* sp. Ces espèces sont les bien adaptées au sel et elles se trouvent dans les bassins les plus salés dans plusieurs salines (DasSarma et Arora, 2001; Dolapsakis et al., 2005; Oren, 2009; Chatchawan et al., 2011).

Afin d'évaluer le potentiel d'une de nos micro-algues, une étude comparative entre *D. salina* et 3 autres micro-algues (*C. vulgaris* et *Nannochloropsis* sp et *I. galbana*) commerciales a été établie. Les caroténoïdes, les protéines, les glucides et les lipides caractéristiques de chaque espèce sont modifiés en fonction de l'intensité et du régime lumineux. L'éclairement continu favorise la production de biomasse des espèces étudiées, sauf chez *D. salina*.

C. vulgaris et *Nannochloropsis* sp. sont riches en protéines. *D. salina* est riches en lipides. Elle renferme de l'acide myristique et l'acide eicosapentaénoïque. *I. galbana* est riche en caroténoïdes, en acides gras poly-insaturés et en acide docosahexaénoïque. *Nannochloropsis* sp. est riche en acide eicosapentaénoïque.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES



Cinquième Partie : Conclusion et perspectives de recherche

Ces travaux ont permis d'évaluer l'impact de la salinité sur les communautés phytoplanctoniques dans la saline de Sfax et au laboratoire chez trois espèces phytoplanctoniques récoltées dans des bassins de salinité croissante.

L'analyse STATICO, qui est une méthode particulièrement adaptée à l'étude des relations stables entre l'abondance des espèces et les paramètres environnementaux, lorsque les deux varient au cours du temps, a confirmé que le gradient de salinité a une influence primordiale sur la partie stable de la distribution des espèces du phytoplancton de la saline de Sfax. Les nutriments peuvent aussi jouer un rôle considérable dans la variation temporelle de la composition des communautés phytoplanctoniques. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette influence. D'autres paramètres importants tels que le niveau d'éclairement, les éléments traces et les procaryotes devront également être pris en compte dans les prochaines études.

Les outils moléculaires ont permis de confirmer l'identification au microscope des trois espèces isolées: *D. salina*, *P. versicolor* et *C. closterium* qui ont été ensuite acclimatées aux conditions expérimentales.

La croissance des trois espèces est influencée par l'ajout de NaCl et le niveau d'éclairement, la Chlorophycée est moins perturbée que la diatomée dont la croissance est totalement inhibée en présence de NaCl 140 g L⁻¹. Sous le plus fort éclairement utilisé (1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), l'ajout de NaCl déclenche l'activation des trois enzymes antioxydants étudiées chez les trois espèces phytoplanctoniques, à l'exception de l'APX chez la cyanobactérie. Le stress oxydant augmente avec le niveau d'éclairement et la salinité chez *D. salina*, les activités SOD et APX augmentent ainsi que la teneur en caroténoïdes, qui sont des antioxydants non enzymatiques, moyen de défense privilégié contre les ROS (Bhandari and Shatma, 2006) surtout chez *D. salina* (Lers et al., 1990; Salguero et al., 2003; Tammam et al., 2011). La synthèse des caroténoïdes est stimulée lorsque les micro-algues sont placées dans des conditions contraignantes comme une carence en éléments nutritifs, un fort éclairement ou une concentration élevée en sel, qui est le cas de notre étude, (Ben-amotz et Avron, 1983; Pisal et Lele, 2005 ; Salguero et al., 2003). Nous pouvons supposer que nos espèces pourraient être des candidates potentielles dans la production de caroténoïdes pour des fins pharmacologiques ainsi que d'autres métabolites comme le glycérol, synthétisé à partir des produits de la photosynthèse qui est stimulé par le sel. À la faible luminosité, l'acide myristique et l'acide

eicosapentaénoïque que renferme *D. salina* peut être exploité à des fins thérapeutiques (Dyerberg et Bang, 1979; Simopoulos et Cleland, 2003; Din et al., 2004; Mozaffarian et Wu, 2011). Un screening des acides gras des autres espèces (*P. versicolor* et *C. closterium*) s'avère important. Une étude complémentaire pourrait comparer les espèces déjà valorisées mais chacune cultivée dans un milieu de culture optimisé pour chaque espèce.

Notre recherche du système SOS, bien décrit chez les plantes pour exclure le sodium des cellules, a été infructueuse. Ce résultat nous laisse penser qu'il existe d'autres types de transporteurs du Na^+ chez les micro-algues qui assurent l'homéostasie. Le nombre de génomes séquencés ne cesse d'augmenter; ainsi une recherche approfondie *in silico* des systèmes de transport du sodium chez les micro-organismes photosynthétiques devrait permettre d'identifier ceux existant chez les trois espèces étudiées et ainsi mieux comprendre comment ces micro-organismes se développent dans la saline.

Il serait aussi intéressant d'étudier plus précisément le fonctionnement de l'appareil photosynthétique à l'aide de l'oxymétrie et la fluorimétrie modulée en utilisant différents inhibiteurs (du gradient de H^+ , de la dé-époxydation, des ATPases) afin de comparer les résultats avec ceux déjà disponibles chez des espèces marines.

Reste à compléter doser les osmolytes tels que la proline, la glycine-bétaïne et le glycérol dans les différentes conditions expérimentales, or ces molécules sont d'un grand intérêt, puisqu'elles assurent l'équilibre osmotique et préservent le bon fonctionnement de la cellule contre l'effet nocif du NaCl.

Bibliographie



Bibliographie

A

Abid, O., Kammoun, A., Ayadi, H., Drira, Z., Bouain, A. and Aleya, L. (2008). Biochemical adaptation of phytoplankton to salinity and nutrient gradients in a coastal solar saltern, Tunisia. *Estuar Coast Shelf S* **80**: 391-400.

Abid, O 2009. Biodiversité, dynamique, métabolisme et structure des peuplements phytoplanctoniques d'un écosystème paralique extrême de la zone aride tunisienne : la saline de Sfax. *Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de Sfax (Tunisie)*, 225p.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Met Enzymol* **105**: 121-126.

Alge, D. and Peschek, G.A., (1993). Characterization of a *ctaCDE* Operon-Like Genomic Region Encoding Subunits I–III of the Cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Biochem Mol Biol Int* **29**: 511-525.

Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., and Suzuki, I. (1999). Genetic Engineering of the Unsaturation of Fatty Acids in Membrane Lipids Alters the Tolerance of *Synechocystis* to Salt Stress. *Proc Natl Acad Sci US* **96**: 5862-5867.

Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y. and Murata, N. (2000a). Inactivation of Photosystems I and II in Response to Osmotic Stress in *Synechococcus*: Contribution of Water Channels. *Plant Physiol* **122**: 1201-1208.

Allakhverdiev, S.I., Sakamoto, A., Nishiyama, Y. (2000b). NaCl-Induced Inactivation of Photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plan Physiol* **123**: 1047-1056.

Allakhverdiev, S.I., Kinoshita, M., Inaba, M., Suzuki, I. and Murata, N. (2001). Unsaturated Fatty Acids in Membrane Lipids Protect the Photosynthetic Machinery against Salt-Induced Damage in *Synechococcus*. *Plant Physiol* **125**: 1842-1853.

Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Miyairi, S., Hiroshi Yamamoto, H., Inagaki, N., Kanesaki, Y. and Murata, N. (2002). Salt Stress Inhibits the Repair of Photodamaged Photosystem II by Suppressing the Transcription and Translation of *psbA* Genes in *Synechocystis*. *Plant Physiol* **130**: 1443-1453.

Allakhverdiev, S.I. and Murata, N. (2004). Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim Biophys Acta* **1657**: 23-32.

- Allen, J.F. (1992).** Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1098**: 275-335.
- Alonso, M., (1990).** Anostraca, Cladocera and Copepoda of Spanish saline lakes. *Hydrobiologia* **197**: 221-231.
- Alverson, A.J., Cannone, J.J., Gutell, R.R and Theriot, E.C. (2006).** The evolution of elongate shape in diatoms. *J Phycol* **42**: 655-668.
- Alverson, A.J. (2008).** Molecular Systematics and the Diatom Species. *Protist.* **159**: 339-353.
- Amdouni, R. (1987).** Étude géochimique des saumures libres, des sédiments et des sels dans la saline de Sfax (Tunisie). *Thèse de doctorat. Université Paris VII*, 241 p.
- Amini, S.R., Ghasemi, Y., Morowvat, M.H. and Mohagheghzadeh A. (2009).** PCR amplification of 18S rRNA, single cell protein production and fatty acid evaluation of some naturally isolated microalgae. *Food Chem* **116**: 129-136.
- Anderson, J.M. (1999).** Insights into the consequences of grana stacking of thylakoid membranes in vascular plants: a personal perspective. *J Plant Physiol* **26**: 625-639.
- Anneville, O., Souissi, S., Gammeter, S. and Straile, D. (2004).** Seasonal and inter-annual scales of variability in phytoplankton assemblages: comparison of phytoplankton dynamics in three peri-alpine lakes over a period of 28 years. *Freshwater Biol* **49** (1): 98-115.
- Apel, K. and Hirt, H. (2004).** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 373-99.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W. A. and Blumwald, E. (1999).** Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285** : 1256-1258.
- Apse, M.P. and Blumwald., E. (2002).** Engineering salt tolerance in plants. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 146-150.
- Apte, S. K. and Thomas, J. (1980).** Sodium Is Required for Nitrogenase Activity in Cyanobacteria. *Curent Microbiol* **3**: 291-293.
- Apte, S.K. and Bhagwat, A. (1989).** Salinity Stress-Induced Proteins in Two Nitrogen-Fixing *Anabaena* Strains ferentially to Salt. *J Bacteriol* **171**: 909-915.
- Apte, S.K. and Haselkorn, R. (1990).** Cloning of Salinity Stress-Induced Genes from the Salt-Tolerant Nitrogen- Fixing Cyanobacterium *Anabaena torulosa*. *Plant Mol Biol* **15**: 723-733.
- Apt, K.E., Behrens, P.W. (1999).** Commercial developments in microalgal biotechnology. *J Phycol* **35**: 215-226.

Armbrust, E.V., Berges, J.A., Bowler, C., Green, B.R., Martinez, D., Putnam, N.H., Zhou, S., Allen, A.E., Apt, K.E., Bechner, M., Brzezinski, M.A., Chaal, B.K., Chiovitti, A., Davis, A.K., Demarest, M.S., Detter, J.C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M.Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B.D., Jurka, J., Kapitonov, V.V., Kröger, N., Lau, W.W. Y. Lane, T.W., Larimer, Frank W.J., Lippmeier, C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M.S, Palenik, B., Pazour, G. J., Richardson, P.M., Rynearson, T.A., Saito, M.A., Schwartz, D.C., Thamatrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F.P., Rokhsar, D.S. (2004). The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism. *Science* **306**: 79-86.

Arrigo, K. R. (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* **437**: 349-355.

Asencio, A.D. (2013). Permanent salt evaporation ponds in a semi-arid Mediterranean region as model systems to study primary production processes under hypersaline conditions. *Estuar. Coast Shelf S* **124**: 24-33.

Assuncao, P., Jaen-Molina, R., Caujape-Castells, J., de la Jara, A., Carmona, L., Freijanes, K. and Mendoza, K. (2012). Molecular taxonomy of *Dunaliella* (Chlorophyceae), with a special focus on *D. salina*: ITS2 sequences revisited with an extensive geographical sampling *Aquat Biosyst* **8**: 1-28.

Ayadi, H., Toumi, N., Abid, O., Medhioub, K., Hammami, M., Sime-Ngando, T., Amblard, C. and Sargos, D. (2002). Etude qualitative et quantitative des peuplements phytoplanctoniques et zooplanctoniques dans les bassins de la saline de Sfax, Tunisie. *Rev Sci Eau* **15** : 123-135.

Ayadi, H., Abid, O., Elloumi, J., Bouaïn, A. and Sime-Ngando, T. (2004). Structure of the phytoplankton in two lagoons of different salinity in the Sfax saltern (Tunisia). *J Plankton Res* **26(6)**: 669-679.



Babcock, T., Helton, W.S. and Espat, N.J. (2000). Eicosapentaenoic acid (EPA): an anti inflammatory ω -3 fat with potential clinical applications. *Nutrition*. **16**: 1116-1118.

Baker, N.R. (1991). A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *PhysiolPlant* **81**: 563-570.

Baker, N.R. and Bowyer, J.R. (1994). Asada, K: Mechanisms for scavenging reactive molecules generated in chloroplasts under light stress, in Photoinhibition of Photosynthesis,

from Molecular Mechanisms to the Field (eds). *Bios. Scientific. Publishers. Oxford, UK*. pp. 129-142.

Balnokin, YV., Medveder, AV. and Bodna, IV. (1984). Potassium transport system in cells of the halophilic alga *Dunaliella*. *Soviet Plant Physiol* **30**: 718-726.

Baroli, I. and Melis, A. (1998). Photoinhibitory damage is modulated by the rate of photosynthesis and by Photosystem II light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta* **205**: 288-296.

Batterton, J. C. and Van Baalen, C. (1971). Growth responses of blue-green algae to sodium chloride concentration. *Arch Microbiol* **76**: 151-165.

Bazzuri, M.E., Gabellone, N. and Solaril, L. (2010). Seasonal variation in the phytoplankton of a saline lowland river (Buenos Aires, Argentina) throughout an intensive sampling period. *River Res Applic* **26**: 766-778.

Behnke, A., Friedl, T., Chepurnov, V.A. and Mann, D.G. (2004). Reproductive compatibility and rDNA sequence analyses in the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *J Phycol* **40**: 193-208.

Belkoura, M., Benider, A. and Dauta, A. (1997). Influence de la température, de l'intensité lumineuse et du stade de croissance sur la composition biochimique de *Chlorella sorokiniana* (Shihira & Krauss). *Annals Limnol* **33** (1): 3-11.

Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1973). The role of glycerol in osmotic regulation of the halophilic alga *Dunaliella parva*. *Plant Physiol* **51**: 875-878.

Ben-Amotz, A. and M. Avron, (1983). On the factors which determine massive β -carotene accumulation in the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol*. **72**: 593-597.

Ben-Amotz, A., Shaish, A. and Avron, M. (1989). Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation. *Plant Physiol* **91**: 1040-1043.

Ben Dhiab R. (2012). Photosynthetic Behavior of Microalgae in Response to Environmental Factors. *Appl Photosynth* www.intechopen.com.

Beneragama, C.K. and Goto, K. (2010). Chlorophyll *a*: *b* Ratio Increases Under Low-light in 'Shade-tolerant' *Euglena gracilis*. *Trop Agr Res* **22** (1): 12-25.

Bental, M., Pick, U., Avron, M. and Degani, H. (1990). The role of intracellular orthophosphate in triggering osmoregulation in the alga *Dunaliella salina*. *Eur J Biochem* **188**: 111-116.

- Berard, A., Dorigo, U., Mercier, I., Becker-van Slooten, K., Grandjean, D. and Leboulanger, C. (2003).** Comparison of the ecotoxicological impact of the triazines Irgarol 1051 and atrazine on microalgal cultures and natural microalgal communities in Lake Geneva. *Chemosphere* **53**: 935-944.
- Bergsland, K. J. and R. Haselkorn. (1991).** Evolutionary relationships among eubacteria, cyanobacteria, and chloroplasts: evidence from the *rpoC1* gene of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J Bacteriol* **173**: 3446-3455.
- Berry, S., Esper, A. and Karandashova, I. (2003a).** Potassium Uptake in the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Mainly Depends on a Ktr-Like System Encoded by *slr1509* (*ntpJ*). *FEBS Lett* **548**: 53-58.
- Berry, S. Bolychevtseva, Y.V. Rögner, M. and Karapetyan, N.V. (2003b).** Photosynthetic and respiratory electron transport in the alkaliphilic cyanobacterium *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. *Photosynth Res* **78**: 67-76.
- Bertorello, A.M. and Jian-Kang Zhu, J.K. (2009).** SIK1/SOS2 networks: decoding sodium signals via calcium-responsive protein kinase pathways. *Eur J Physiol* **458**: 613-619.
- Beszteri, B., Acs, E., Makk, J., Kovacs, G., Marialigeti, K., and Kiss, TK. (2001).** Phylogeny of six naviculoid diatoms based on 18S rDNA sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1581-1586.
- Beszteri, B., Acs, E., Medlin, L.K. (2005).** Ribosomal DNA sequence variation among sympatric strains of the *Cyclotella meneghiniana* complex (Bacillariophyceae) reveals cryptic diversity. *Protist* **156**: 317-333.
- Beyer, W. F. and Fridovich, I. (1987).** Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem* **161**: 559-566.
- Bhattacharyya, P. and Volcani, B. E. (1980).** Sodium-dependent silicate transport in the apochlorotic marine diatom *Nitzschia alba*. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 6386-6390.
- Bhandari, R. and Shatma, P.K. (2006).** High-light-induced Changes on Photosynthesis, Pigments, Sugars, Lipids and Antioxidant Enzymes in Freshwater (*Nostoc spongiaeforme*) and Marine (*Phormidium corium*) Cyanobacteria. *Photochem Photobiol* **82**: 702-710.
- Bhattacharay, D., L. Medlin, P.O., Wainwright, E.V., Ariztia, C., Bibeau, S. K. Stickel, K. and Sogin, M. L. (1992).** Algae containing chlorophylls *a* + *c* are paraphyletic: molecular evolutionary analysis of the Chromophyta. *Evolution*. **46**: 1808-1817.

- Bissati, K. E., Delphin, E., Murata, N., Etienne, A.L. and Kirilovsky, D. (2000).** Photosystem II fluorescence quenching in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803: involvement of two different mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1457** : 229-242.
- Bisson, M.A. and Kirst, G.O. (1995).** Osmotic acclimation and turgor pressure regulation in algae. *Naturewissenschaften* **82**: 461-471.
- Bjorkman, O. and Demmig, B. (1987).** Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77-K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170** : 489-504.
- Blumwald, E., Melhorn, R. and Packer, L. (1983).** Ionic Osmoregulation during Salt Adaptation of the Cyanobacterium *Synechocystis* 6311. *Plant Physiol* **73**: 377-380.
- Blumwald, E., Wolosin, J.M. and Packer, L. (1984).** Na⁺/H⁺ Exchange in the Cyanobacterium *Synechococcus* 6311. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**: 452-459.
- Blumwald, E., Aharon, G.S and Apse, M.P. (2000).** Sodium transport in plant cells. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 140-151.
- Borowitzka, L.J. and Brown, A.D. (1974).** The Salt Relations of Marine and Halophilic Species of the Unicellular Green Alga, *Dunaliella*. The Role of Glycerol as a Compatible Solute. *Arch Microbiol* **72**: 37-52.
- Borowitzka, M.A. and Siva, C.J. (2007).** The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *J Appl Phycol* **19**: 567-590.
- Boulay, C., Abasova, L., Six, C., Vass, I. and Kirilovsky, D. (2008).** Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 1344-1354.
- Bourre, J.M. (2007).** Dietary omega-3 fatty acids for women. *Biomed Pharmacother* **61**: 105-112.
- Bourrelly, P. (1966).** Les algues d'eau douce. *Boubée N. et Cie Ed., Paris*.
- Bowler, C., Montagu, M.V. and Inze, D. (1992).** Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **43**: 83-116.
- Bowler, C., Allen, A.E., Badger, J.H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F., O'tillar, R.P., Rayko, E., Salamov, A., Vandepoele, K., Beszteri, B., Gruber, A., Heijde, M., Katinka, M., Mock, T., Valentin, K., Verret, F., Berges, J.A., Brownlee, C., Cadoret, J.P., Chiovitti, A., Choi, C.J., Coesel, S., De Martino, A., Detter, J.C., Durkin, C., Falciatore, A., Fournet, J., Haruta, M., Huysman,**

- M.J. J., Jenkins, B.D., Jiroutova, K., Jorgensen, R.E., Joubert, Y., Kaplan, A., Krôger, N., Kroth, P.G., La Roche, J., Lindquist, E., Lommer, M., Martin-Je'ze'quel, V., Lopez, P.J., Lucas, S., Mangogna, M., McGinnis, K., Medlin, L.K., Montsant, A., Oudot-Le Secq, M.P., Napoli, C., Obornik, M., Parker, M.S., Petit, J.L., Porcel, B.M., Poulsen, N., Robison, M., Rychlewski, L., Rynearson, T.A., Schmutz, J., Shapiro, H., Siaut, M., Stanley, M., Sussman, M.R., Taylor, A.R., Vardi, A., Dassow, P.v., Vyverman, W., Willis, A., Wyrwicz, L.S., Rokhsar, D.S., Weissenbach, J., Armbrust, E.V., Green, B.R., Van de Peer, Y., and Grigoriev, I.V. (2008). The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature* **456**: 239-244.
- Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448.
- Boyer, S.L. Johansen, J.R. and Flechtner V.R. (2002). Phylogeny and Genetic Variance in Terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) Species Based on Sequence Analysis of the 16S rRNA Gene and Associated 16S-23S ITS Region. *J Phycol* **38**: 1222-1235.
- Bremauntz, M.D.P., Torres-Bustillos, L.G., Cañizares-Villanueva, R.O. Paramo, E. Fernández-Linares D.L. (2011). Trehalose and Sucrose Osmolytes Accumulated by Algae as Potential Raw Material for Bioethanol. *Nat. Resour.* **2**: 173-179.
- Brett, C.L., Donowitz, M., and Rao, R. (2005). Evolutionary origins of eukaryotic sodium/proton exchangers. *Am J Physiol Cell Physiol* **288** : 223-239.
- Briand, J.F., Jacquet, S., Bernard, C. and Humbert, J.F. (2003). Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Vet Res* **34**: 361-377.
- Brott, L.L., Nait, R.R., Pikas, D.J., Kirkpatrick, S.M. and Tomiln, D.W., (2001). Ultra fast holographic nanopatterning of biocatalytically formed silica. *Nature* **413**: 29-93.
- Bualuang, A., Soontharapirakkul, K. and Incharoensakdi.A. (2010). Na⁺/H⁺ exchange activity in the alkaliphile halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *J Appl Phycol* **22**: 123-129.
- Buchel, C. and Wilhem, C. (1993). In vivo analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: progress, problems and perspectives. *Photochem Photobiol* **58**: 137-148.
- Bukhov, N. and Carpentier, R. (2004). Alternative Photosystem I-driven electron transport routes: mechanisms and functions. *Photosynth Res* **82**: 17-33.
- Bulté, L., Gans, P., Rebéillé, F. and Wollman, F.A. (1990). ATP control on state transitions in vivo in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1020**: 72-80.



- Caisová, L. (2011).** Molecular phylogeny and taxonomic revision of chaetophoralean algae (Chlorophyta). *These de doctorat. Université de Bohême (République Tchèque)*, 37p.
- Carassou, L. and Ponton, D. (2007).** Spatio-temporal structure of pelagic larval and juvenile fish assemblages in coastal areas of New Caledonia, southwest Pacific. *Mar Biol* **150**: 697-711.
- Carrias, J.F., Amblard, C. and Bourdier, G. (1996).** Protistan bacteriovory in an oligomesotrophic lake: importance of attached ciliates and flagellates. *Microb Ecol* **31**: 249-268.
- Casamatta, D. A., Johansen, J. R., Vis, M. L. and Broadwater, S. T. (2005).** Molecular and morphological characterization of ten polar and near polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *J Phycol* **41**: 421-38.
- Casper-Lindley, C. and Bjorkman, O. (1998).** Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth Res* **56**: 277-289.
- Caudales, R. and Wells. J. M. (1992).** Differentiation of free-living *Anabaena* and *Nostoc* cyanobacteria on the basis of fatty acid composition. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 246-251.
- Chaker, K., Elhabeib, A., Dhieb, M. and Dlensi, H. (2000).** Production des colonies avifaunes nicheuses des salines de thyna, Sfax: Fonds pour l'environnement mondial, Programme des nations unies pour le développement (FEM/PNUD). *Diagnostic et plan d'action*, 47 p.
- Chamovitz, D., Sandmannll, G. and Hirschberg, J. (1993).** Molecular and Biochemical Characterization of Herbicide-resistant Mutants of Cyanobacteria Reveals That Phytoene DesaturatioIsn a Rate-limiting Step in Carotenoid Biosynthesis. *J Biol Chem* **268 (23)**: 17348-1735.
- Chanroj, S., Wang, G., Venema, K., Zhang, M. W, Delwiche, C.F. and Sze., H. (2012).** Conserved and diversified gene families of monovalent cation /H⁺ antiporters from algae to flowering plants. *Plant Physiol.* **3**: 1-18.
- Chatchawan, T., Peerapornpisal, Y. and Komárek, J. (2011).** Diversity of cyanobacteria in man-made solar saltern, Petchaburi Province, Thailand-a pilot study. *Fottea* **11(1)**: 203-214.
- Chen, H. and Jiang, J.G. (2009).** Osmotic Responses of *Dunaliella* to the Changes of Salinity. *J Cell Physiol* **219**: 251-258.

- Chrétiennot-Dinet, M.J. (1990).** Atlas du phytoplancton marin Volume 3: Chlororachinophycées, chlorophycées, chrysophycées, cryptophycées, euglénophycées, eustigmatophycées, prasinophycées, prymnésiohycées, rhodophycées, tribophycées. Éditions du centre national de la recherche scientifique, Paris. *Ed p144*.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. and Zhu, J.K. (2006).** Salt stress signaling and mechanisms of plant. Salt tolerance. *Genet. Eng., Volume 27, Edited by J. K. Setlow*.
- Chojnacka, K., Chojnacka, A. and Gorecka, H. (2004).** Trace element removal by *Spirulina* sp. from copper smelter and refinery effluents. *Hydrometallurgy* **73**:147-153.
- Chojnacka, K., Chojnacka, A. and Gorecka, H. (2005).** Biosorption of Cr^{3+} , Cd^{2+} , and Cu^{2+} ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere* **59**:75-84.
- Choo, K.S., Snoeijs, P. and Pedersén, M. (2004).** Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneriana*. *J Exp Mar Biol Ecol* **298**: 111-123.
- Claquin, P., Martin-Jézéquel, V., Kromkamp, J.C., Veldhuis, M.J.W. and Kraay, G.W. (2002).** Uncoupling of silicon compared with carbon and nitrogen metabolisms and the role of the cell cycle in continuous cultures of *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) under light, nitrogen, and phosphorus control. *J Phycol* **38**: 922-930.
- Claustre, H. and Gostan, J. (1987).** Adaptation of biochemical composition and cell size to irradiance in two microalgae: possible ecological implications. *Mar Ecol Prog Ser* **40** : 167-174.
- Coleman, A.W. (2003).** ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet* **19**: 370-375.
- Coleman, A. W. (2009).** Is there a molecular key to the level of "biological species" in eukaryotes? A DNA guide. *Mol Phylogenet Evol* **50**: 197-203.
- Courtney, E.D., Matthews, S., Finlayson, C., Di Pierro, D., Belluzzi, A., Roda, E., Kang, J.Y. and Leicester, R.J. (2007).** Eicosapentaenoic acid (EPA) reduces crypt cell proliferation and increases apoptosis in normal colonic mucosa in subjects with a history of colorectal adenomas. *Int J Colorectal Dis* **22 (7)**: 765-76.
- Croft, M.T., Lawrence, A.D., Raux-Deery, E., Warren M.J. and Smith A.G. (2005). Algae acquire vitamin B12 through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* **438** : 90-93.



- D'Alelio, D., Amato, A., Kooistra, W.H.C.F., Procaccini G., Casotti, R. and Montresor, M. (2009).** Internal Transcribed Spacer Polymorphism in *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) in the Gulf of Naples: Recent Divergence or Intraspecific Hybridization? *Protist* **160**: 9-20.
- DasSarma, S. and Arora, P. (2001).** Halophiles. Encyclopedia of life sciences. *Nature Publishing Group* .www.els.net (accessed: March 2012).
- Dahech, S., Beltrando, G. and Hénia, L. (2007).** Le sirocco et son impact sur l'agriculture et la qualité de l'air dans la région de Sfax (Tunisie). *Sécheresse* **18** (3): 177-84.
- Daoud, A. and Dahech, S. (2012).** Résilience de l'agglomération de Sfax (Tunisie Méridionale) face au changement climatique : essai d'évaluation. *Association internationale de climatologie*.
- Daugbjerg, N. and Guillou, L. (2001).** Phylogenetic analyses of Bolidophyceae (Heterokontophyta) using *rbcL* gene sequences support their sister group relationship to diatoms. *Phycologia* **40** (2) : 153-161.
- Davis, J.S. (1978)** Biological communities in ambient enriched salina. *Aq. Bot.* **4**: 29-42.
- Davis, J. and Giordano, M. (1996).** Biological and physical events involved in the origin, effects, and control of organic matter in solar saltworks. *Int J Salt Lake Res* **4**: 335-347.
- Davis, J.S. (2000).** Structure, function, and management of the biological system for seasonal solar saltworks. *Global Nest: the Int. J.* **2** (3): 217-226.
- Debelius, B., Gomez-Parra, A. and Forja, J.M. (2009).** Oxygen solubility in evaporated seawater as a function of temperature and salinity. *Hydrobiologia* **632**: 157-165.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F. and Pinelli, E. (2009).** A new cell primoculture method for freshwater benthic diatom communities. *J Appl Phycol* **21**: 65-73.
- Del Campo, E. M., Casano, L. M., Gasulla, F. and Barreno, E. (2010).** Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming *Trebouxia* algae. *Mol Phylogenet Evol* **54**: 437-444.
- Demmig-Adams, B. and Adams, W.W. (1996).** The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* **1**: 21-26.
- Deniz, F., Saygideger, S. D. and Karaman, S. (2011).** Response to Copper and Sodium Chloride Excess in *Spirulina* sp. (Cyanobacteria). *Bull Environ Contam Toxicol* **87**: 11-15.
- Din, J.N., Newby, D.E. and Flapan, A.D. (2004).** Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease: fishing for a natural treatment. *B M J* **328**: 30-35.

- Dolapsakis, N.P., Tafas, T., Abatzopoulos, T.J., Ziller, S. and Amilli, A.E. (2005).** Abundance and growth response of microalgae at Megalon Embolon solar saltworks in northern Greece: An aquaculture prospect. *J Appl Phycol* **17**: 39-49.
- Dolédec, S. and Chessel, D. (1994).** Co-inertia analysis: an alternative method for studying species-environment relationships. *Freshwater Biol* **31**: 277-294.
- Dorador, C., Vila, I., Imhoff, J.F. and Witzel, K.P. (2008).** Cyanobacterial diversity in Salar de Huasco, a high altitude saline wetland in northern Chile: an example of geographical dispersion. *FEMS Microbiol Ecol* **64** : 419-432.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990).** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.
- Duan, Y.J., Murase, S., Okuda, J., Tamura, A. and Miwa, I. (1997).** Stimulatory effect of fatty acid treatment on glucose utilization in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **1334**: 89-97.
- Duan, X., Zhang, W., Li, X. and Wang, B. (2006).** Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chem* **95**: 37-43.
- Dufour P and Durand J.R. (1982).** La production végétale des lagunes de Côte d'Ivoire. *Rev Biol Trop* **15** (3): 209-230.
- Dyerberg, J. and Bang, H.O. (1979).** Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids. *Eskimos Nutrition* **11**: 475-476.



- Edgar, L.A., and Zavortink, M. (1983).** The Mechanism of Diatom Locomotion. II Identification of Actin. *Proc R. Soc Lond B* **218**: 345-348.
- Ehrenfeld, J and Cousin, J.L. (1984).** Ionic regulation of the unicellular green alga *Dunaliella tertiolecia*. *J Membr Biol* **70**: 47-57.
- Elfwing, T., Blidberg, E., Sison, M. and Tedengren, M. (2003).** A comparison between sites of growth, physiological performance and stress responses in transplanted *Tridacna gigas*. *Aquaculture* **219**: 815-828.
- Elloumis, 2006.** Distribution et rôle des microorganismes de la boucle microbienne dans la saline de Sfax: Contribution à l'étude du fonctionnement microbiologique d'un milieu extrême. *Thèse de doctorat. Faculté des Sciences de Sfax (Tunisie), 254p.*

- Elloumi, J., Guerhazi, W., Ayadi, H., Bouaïn, A and Aleya, L. (2008).** Detection of Water and Sediments Pollution of An Arid Saltern (Sfax, Tunisia) by Coupling the Distribution of Microorganisms With Hydrocarbons. *Water Air Soil Pollut* **187**: 157-171.
- Elloumi, J., Carrias, J.F., Ayadi, H., Telesphore, S.N. and Bouaïn, A., (2009).** Communities structure of the planktonic halophiles in the solar saltern of Sfax, Tunisia. *Estuar Coast Shelf S* **81**: 19-26.
- Erdmann, N., Fulda, S. and Hagemann, M. (1992).** Glucosylglycerol accumulation during salt acclimation of two unicellular cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **138**: 363-368.
- Eskling, M., Arvidson, P. and Akerlund, H. (1997).** The xanthophylls cycle, its regulation and components. *Physiol Plant* **100**: 806-816.
- Espinoza, E.V., Nùñez, R.M. and Cebrero, F.N. (2002).** Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacult Eng* **25**: 207-216.

J

- Fabregas, J, Maseda, A., Domínguez, A., Ferreira, M. and Otero, A. (2002).** Changes in the cell composition of the marine microalga, *Nannochloropsis gaditana*, during a light:dark cycle. *Biotechnol Lett* **24**: 1699-1703.
- Fábregas, J., Maseda, A., Dominguez, A. and Otero, A. (2004).** The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World J Microb Biot* **20**: 31-35.
- Falciatore, A. and Bowler, C. (2002).** Revelaling the molecular secrets of marine diatoms. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 109-30.
- Falkowski, P.G. and LaRoche, J. (1991).** Acclimation to spectral irradiance in algae. *J Phycol* **27**: 8-14.
- Falkowski, P.G. (2000).** Rationalizing elemental ratios in unicellular algae. *J Phycol* **36**: 3-6.
- Fernandes, T.A., Iyer, V. and Apte, S.K. (1993).** Differential Responses of Nitrogen-Fixing Cyanobacteria to Salinity and Osmotic Stresses. *Appl Environ Microbiol* **59**: 899-904.
- Fernandez, P., Di Rienzo, J., Fernandez, L., H, Hopp, E., Paniego, N. and Heinz. R. A. (2008).** Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. *Plant Biology* **8**:11 doi:10.1186/1471-2229-8-11.

Finel, M., Pick, U., Selman-Reimer, S. and Selman, B.R. (1984). Purification and Characterization of a Glycerol-Resistant CFo-CF1 and CF1-ATPase from the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol* **74**: 766-772.

Fritsch, F. E. (1904). Studies on Cyanophyceae. *New Phytol* **3**: 216-228.

Fujiki, T., Toda, T., Tomohiko Kikuchi, T. and Taguchi, S. (2003). Photoprotective response of xanthophyll pigments during phytoplankton blooms in Sagami Bay, Japan *J Plankton Res* **25(3)**: 317-322.

Fukuda, A., Nakamura, A. and Tanaka, Y. (1999). Molecular cloning and expression of the Na⁺/H⁺ exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta* **1446**: 149-155.

Fulda, S., Hagemann, M. and Libber, E. (1990). Release of glucosylglycerol from the cyanobacterium *Synechocystis* spec. SAG 92.79 by hypoosmotic shock. *Arch Microbiol* **153**: 405-408.

Fulda, S., Huang, F. and Nilsson, F. (2000). Proteomics of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803: Identification of Periplasmic Proteins in Cells Grown at Low and High Salt Concentrations. *Eur J Biochem* **267**: 5900-5907.



Gabbay-Azaria, R., Schonfeld, M., Tel-or, S., Messinger, R. and Tel-or, E. (1992). Respiratory activity in the marine cyanobacterium *Spirulina subsalsa* and its role in salt tolerance. *Arch Microbiol* **157**: 183-190.

Gaber, A., Yoshimura, K., Tamoi, M., Takeda, T., Nakano, Y. and Shigeoka, S. (2004). Induction and Functional Analysis of Two Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Dependent Glutathione Peroxidase-Like Proteins in *Synechocystis* PCC 6803 during the Progression of Oxidative Stress. *Plant Physiol* **136**: 2855-2861.

Gastineau, R., (2001). Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du genre *Haslea* et valorisation de leurs pigments de type marennine. *Thèse de doctorat. Université du Maine (France)*, 328p.

Gaxiola, RA., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, SL. and Fink, GR. (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad. Sci USA* **96**: 1480-1485.

Geoffroy, L., Teisseire, H., Couderchet, M. and Vernet, G. (2002). Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. *Pes Biochem Physiol* **72**: 178-185.

- Geoffroy, L., Frankart, C. and Eullaffroy, P. (2004).** Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environ Pollut* **131**: 233-241.
- Gilabert, J. (2001).** Seasonal plankton dynamics in a Mediterranean hypersaline coastal lagoon: the Mar Menor. *J Plankton Res* **2**: 207- 217.
- Gilmour, D.J., Hipkins, M.F., Webber, A.N., Baker, N.R. and Boney, A.D. (1985).** The effect of ionic stress on photosynthesis in *Dunaliella tertiolecta*. *Planta* **163**: 250-256.
- Gilstad, M., Johnsen, G. and Sakshaug, E. (1993).** Photosynthetic parameters, pigment composition and respiration rates of the marine diatom *Skeletonema costatum* in continuous light and a 12:12 h light-dark cycle. *J Plankton Res* **15**: 939-951.
- Godhe, A., McQuoid, M.R., Karunasagar, I., Karunasagar, I. and Rehnstam-Holm, A.S. (2006).** Comparison of three common molecular tools for distinguishing among geographically separated clones of the diatom *Skeletonema marinoi* Sarno et Zingone (Bacillariophyceae). *J Phycol* **42**: 280-291.
- Gomez, P.I. and Gonzalez, M.A. (2004).** Genetic variation among seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with industrial potential, based on RAPD banding patterns and on nuclear ITS rDNA sequences. *Aquaculture* **233**:149-162.
- Gómez, P.I. and González, M.A. (2005).** The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biol Res* **38**: 151-162.
- Gontcharov, A. A., Marin, B. and Melkonian, M. (2004).** Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using SSU rDNA and rbcL sequence comparisons in the Zygnematophyceae (Streptophyta). *Mol Biol Evol* **21**: 612-624.
- González, M.A., Coleman, A.W. And Gómez, P.I., Montoya, R. (2001).** Phylogenetic relationship among strains of *Dunaliella* (Chlorophyceae) based on nuclear ITS rDNA sequences. *J Phycol* **37**: 604-611.
- Gordillo, F. J.L., Jimenez, C., Chavarria, J. and Niell, F.X. (2001).** Photosynthetic acclimation to photon irradiance and its relation to chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in the halotolerant green alga *Dunaliella viridis*. *Photos Res* **68**: 225-235.
- Goodstine, S.L., Zheng, T., Holford, T.R., Ward, B.A., Carter, D., Owens, P.H. and Mayne, S.T. (2003).** Dietary (n-3)/(n-6) fatty acid ratio: possible relationship to premenopausal but not postmenopausal breast cancer risk in U.S. women *J Nutr* **133 (5)**: 1409-1414.

- Gordon, R. and Parkinson J. (2005).** Potential Roles for Diatomists in Nanotechnology. *J Nanosci Nanotech* **5**: 51-56.
- Greenway, H. and Munns, R. (1980).** Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu Rev Plant Physiol* **31**: 149-190.
- Grobbelaar, J.U., Kroon, B.M. A., Burger-Wiersma, T. and Mur, L.R. (1992).** Influence of medium frequency light/dark cycles of equal duration on the photosynthesis and respiration of *Chlorella pyrenoidosa*. *Hydrobiologia* **238**: 53-62.
- Grobbelaar, J.U. (2010).** Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynth Res* **106**: 135-144. doi: 10.1007/s11120-010-9573-5.
- Grover, J.P. and Chrzanowski, T.H. (2006).** Seasonal dynamics of phytoplankton in two warm temperate reservoirs: association of taxonomic composition with temperature. *J Plankton Res* **28** (1):1-17.
- Guangfeng, K., Cuijuan, S., Xiaofei, W, Qiuju, X, Min, W, Xinlei, W. and Jinlai. M. (2012).** Acclimatory responses to high-salt stress in *Chlamydomonas* (Chlorophyta, Chlorophyceae) from Antarctica. *Acta Oceanol* **31**: 116-124.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M. and Malcata, F.X. (2011).** Microalgae as a sources of carotenoids. *Mar. Drugs* **9**: 625-644. Doi: 10.3390/md9040625.
- Guihéneuf, F., Fouqueray, M., Mimouni, V., Ulmann, L., Jacquette, B. and Tremblin, G. (2010).** Effect of UV stress on the fatty acid and lipid class composition in two marine microalgae *Pavlova lutheri* (Pavlovophyceae) and *Odontella aurita* (Bacillariophyceae). *J Appl Phycol* **22**: 629-638.
- Guo, Y.L. and Roux, S.J. (1990).** Partial purification and characterization of a Ca^{2+} -dependent protein kinase from the green alga, *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* **94**: 143-150.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J.K. (2001).** Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**: 1383-400.
- Guzman, S., Gato, A. and Galleja, J.M. (2001).** Anti-inflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytother Res* **15**: 224-230.



- Haghjoui, M.M., Shariatia, M. and Smirnoff, N. (2009).** The effect of acute high light and low temperature stresses on the ascorbate-glutathione cycle and superoxide dismutase activity in two *Dunaliella salina* strains. *Physiol Plant* **135**: 272-280.
- Hagiwara, S., Bolige, A., Zhang, Y., Takahashi, M., Yamagishi, A. and Goto. K. (2002).** Circadian gating of photoinduction of commitment to cell-cycle transitions in relation to photoperiodic control of cell reproduction in *Euglena*. *Photochem. Photobiol.* **76** (1): 105-115.
- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M.A., Mohammadi, N., Soltani, N., Oveisi, M.R. and Nafissi-Varcheh, N. (2010).** Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J Appl Phycol.***22**: 43-50.
- Halfter, U., Ishitani, M. and Zhu, J.K. (2000).** The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3730-34.
- Hamada, A., Hibino, T., Nakamura, T. and Takabe, T. (2001).** Na⁺/H⁺ Antiporter from *Synechocystis* Species PCC 6803, Homologous to SOS1, Contains an Aspartic Residue and Long C-Terminal Tail Important for the Carrier Activity. *Plant Physiol* **125**: 437-446.
- Hamsher, S.E., Evans, K.M., Mann, D.G., Poulicková, A. and Saunders, G.W. (2011).** Barcoding Diatoms: Exploring Alternatives to COI-5P. *Protist* **162** (3): 405-422.
- Hamza I.S. (2010).** Caractérisation physiologique et moléculaire de deux microalgues planctoniques de la saline de Sfax (Tunisie). *Master. Université du Maine (France)* 27p.
- Han, H., Li, Y. and Zhou, S. (2008).** Overexpression of phytoene synthase gene from *Salicornia europaea* alters response to reactive oxygen species under salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Biotechnol Lett* **30**: 1501-1507.
- Harrison P. J., Waters R. E. and Taylor F. J. R. (1980).** A broad spectrum artificial seawater medium for coastal and open ocean phytoplankton. *J Phycol* **16**: 28-35.
- Harwati, T.U., Willke, T. and Vorlop, K.D. (2012).** Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae *Chlorococcum* sp. *Bioresour Technol* **121**: 54-60.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. and Bohnert, H. J. (2000).** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 463- 499.

- Hagemann, M., Schoor, A. and Jeanjean., R. (1987).** The Gene *stpA* from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Encodes for the Glucosylglycerol-Phosphate Phosphatase Involved in Cyanobacterial Salt Adaptation. *J Bacteriol* **179**: 1727-1733.
- Hagemann, M., Wolfel, L. and Krüger, B. (1990).** Alterations of Protein Synthesis in the Cyanobacterium *Synechocystis* spec. PCC 6803 after a Salt Shock, *J Gen Microbiol* **136**: 1393-1399.
- Hagemann, M., Fulda, S. and Shubert, H. (1994).** DNA, RNA and Protein Synthesis in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Adapted to Different Salt Concentrations *Curr Microbiol* **28**: 201-207.
- Hagemann, M. and Erdann, N. (1997).** Environmental stresses. In: AK (ed). Cyanobacterial nitrogen metabolism and environmental biotechnology. *Springer, Berlin Heidelberg New York and Narosa, New delhi*. p156-221
- Hagen, C., Braune, W., Vogel, K. and Hâder, P.P. (1993).** Functional aspects of secondary carotenoids in *Haematococcus lacustris* (Giröd) Rostafinski (Volvocales). Influences on photomovement. *Plant Cell Environ* **16**: 991-995.
- Hašler, P., Dvorak, P., Johansen, J.R., Kitner, M., Ondřej, V. and Pouličková, P. (2012).** Morphological and molecular study of epipellic filamentous genera *Phormidium*, *Microcoleus* and *Geitlerinema* (Oscillatoriales, Cyanophyta/Cyanobacteria). *Fottea. Olomouc.* **12 (2)**: 341-356.
- Hellebust. J.A. (1985).** Mechanisms of response to salinity in halotolerant microalgae. *Plant Soil* **89**: 69-81.
- Hejazi, M.A., Barzegari, A., Gharajeh, N.H. and Hejazi, M.S. (2010).** Introduction of a novel 18S rDNA gene arrangement along with distinct ITS region in the saline water microalga *Dunaliella*. *Saline Systems.* **6**: 1-11.
- Herrmann, H., Hader, D.P., Kofferlein, M., Seidlitz, H.K. and Ghetti, F. (1996).** Effects of UV radiation on photosynthesis of phytoplankton exposed to solar simulator light. *J Photochem Photobiol B* **34**: 21-28.
- Herrero, M.J.L., Martín-Alvarez, P.J., Cifuentes, A. and Ibanez, E. (2006).** Optimization of the extraction of antioxidants from *Dunaliella salina* microalga by pressurized liquids. *J Agric Food Chem* **54**: 5597-5603.
- Hernandez, J.A., Ferrer, M.A., Jimenez, A., Barcelo, A.R. and Sevilla, F. (2001).** Antioxidant Systems and O_2^-/H_2O_2 Production in the Apoplast of Pea Leaves. Its Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. *Plant Physiol* **127**: 817-831.

- Herrmann, H., Hader, D.P. and Ghetti, F. (1997).** Inhibition of photosynthesis by solar radiation in *Dunaliella salina*: relative efficiencies of UV-B, UV-A and PAR. *Plant Cell Environ* **20**: 359-365.
- Herrmann, H., Hader, D.P., Kofferlein, M., Seidlitz, H.K. and Ghetti, F. (1996).** Effects of UV radiation on photosynthesis of phytoplankton exposed to solar simulator light. *J Photochem Photobiol* **34**: 21-28.
- Hillary, C., Roney, Booth, G.M. and Cox, P.A. (2009).** Competitive exclusion of Cyanobacterial species in the Great Salt Lake. *Extremophiles* **13**: 355-361.
- Hillebrand, H., Dürselen. C.D., Kirschtel, D., Pollingher, U. and Zohary T. (1999).** Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J Phycol* **35**: 403-424.
- Ho, S.H., Huang, S.W., Chen, C.Y., Hasunuma, T., Kondo, A. and Chang, J.S. (2013).** Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. *Bioresour Technol* **135**:157-165.
- Holm, A.S.R. and Godhe, A. (1995).** Genetic Engineering of Algal Species. *Biotechnology. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*.
- Horie, T. and Schroeder, J.I. (2004).** Sodium Transporters in Plants Diverse Genes and Physiological Functions. *Plant Physiol* **136**: 2457-2462.
- Horrocks, L.A. and Yeo, Y.K. (1999).** Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res* **40 (3)**: 211-225.
- Hu, J., Jin, L., Wang, X., Cai, W., Liu, Y. and Wang, G. (2014).** Response of photosynthetic systems to salinity stress in the desert cyanobacterium *Scytonema javanicum*. *Adv Space Res* **53** : 30-36.
- Huang, B. (2013).** Effet de la température sur la croissance, les pigments et la photosynthèse chez la diatomée *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 646. *Master, Université du Maine (France)* 34p.
- Huzisige., H. and Ke, B. (1993).** Dynamics of the history of photosynthesis. *Photosynth Res* **38**: 185-209.



- Inaba, M., A. Sakamoto, and N. Murata. (2001).** Functional expression in *Escherichia coli* of low-affinity and high-affinity Na⁺ (Li⁺)/H antiporters of *Synechocystis*. *J Bacteriol* **183**:1376-1384.

Ishitani, M., Takabe, T., Kojima, K., and Takabe, T. (1993) Regulation of glycine betaine accumulation in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Aust J Plant Physiol* **20: 693-703.**

Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.S., Shi, W., and Zhu, J.K. (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium-binding. *Plant Cell* **12**: 1667-1677.

Iyer, V., Fernandes, T., and Apte, S.K., (1994). A Role for Osmotic Stress-Induced Proteins in the Osmotolerance of a Nitrogen-Fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain L-31. *J Bacteriol* **176**: 5868-5870.



Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O. and Thomashow, M.F. (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**: 104-106.

Jahnke, L.S. (1999). Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation. *J Photochem Photobiol B Biol* **48**: 68-74.

Jahnke, L.S. and White, A.L. (2003). Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *J Plant Physiol* **160**: 1193-1202.

Jaime, L., Mendiola, J.A., Herrero, M., Soler-Rivas, C., Santoyo, S., Senorans, F.J., Cifuentes, A. and Ibanez, E. (2005). Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC and HPLC/DAD. *J Sep Sci* **28**: 2111-2119.

Jang, J.Y., Kim, D.G., Kim, Y.O., Kim, J.S. and Kang H. (2004). An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Bio* **54**: 713-725.

Janknegt, P. J., Rijstenbil, J. W., van de Poll, W. H., Gechev, T. S., Buma, A. G. J. (2007). A comparison of quantitative and qualitative superoxide dismutase assays for application to low temperature microalgae. *J Photochem Photo Biol* **87**: 218-226.

Janssen, M., Janssen, M., de Winter, M., Tramper, J., Mur, L.R., Snel, J., Wijffels, R.H. (2000). Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium duration light/dark cycles. *J Biotechnol*. **78**: 123-137.

- Jeanjean, R., Matthijs, H.C.P., Onana, B. (1993).** Exposure of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 to Salt Stress Induced Concerted Changes in Respiration and Photosynthesis. *Plant Cell Physiol* **34**: 1073-1079.
- Jeanjean, R., Bedu, S. and Havaux, M. (1998).** Salt-Induced Photosystem I Cyclic Electron Transfer Restores Growth on Low Inorganic Carbon in a Type 1 NAD(P)H Dehydrogenase-Deficient Mutant of *Synechocystis* PCC 6803. *FEMS Microbiol Lett* **167**: 131-137.
- Jeffrey, S.W. and Humphrey, G.F. (1975).** New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol Pflanzen* **167**:191-194. In: Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW (eds, 1997) Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods, UNESCO Publishing, Paris, p595-606.
- Jimenez, C. and Pick, U. (1993).** Differential reactivity of β -carotene isomers from *Dunaliella bardawil* toward oxygen radicals. *Plant Physiol* **101**: 385-390.
- Jin, E., Yokthongwattana, K., Polle, J.E.W. and Melis, A. (2003).** Role of the Reversible Xanthophyll Cycle in the Photosystem II Damage and Repair Cycle in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* **132**: 352-364.
- Joset, F., Jeanjean, R. and Hagemann, M. (1996).** Dynamics of the Response of Cyanobacteria to Salt Stress: Deciphering the Molecular Events. *Physiol Plant* **96**: 738-744.



- Kaku, N., Hibino, T., Tanaka, Y. (2000).** Effects of Overexpression of *Escherichia coli* *katE* and *bet* Genes on the Tolerance for Salt Stress in a Freshwater Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Sci* **159**: 281-288.
- Kaňa, R., Prášil, O., Komárek, O., Papageorgiou, G.C. Govindjee. (2009).** Spectral characteristic of fluorescence induction in a model cyanobacterium, *Synechococcus* sp. (PCC 7942). *Biochim Biophys Acta* **1787**: 1170-1178.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (1996).** Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803: II. Sequence

determination of the entire genome and assignment of potential protein coding regions. *DNA Res* **3**: 109-136.

Kang, J.X. (2011). Omega-3: A Link between global climate change and human health. *Biotechnol Adv* **29**(4): 388-390.

Kaplan, A., Volokita, M., Zenvirth, D. and Reinhold, L. (1984). An Essential Role for Sodium in the Bicarbonate Transporting System of the Cyanobacterium *Anabaena variabilis*, *FEBS Lett* **176**: 166-168.

Karandashova, I., Elanskaya, I. and Marin, K. (2002). Identification of Genes Essential for Growth at High Salt Concentrations Using Salt-Sensitive Mutants of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Curr Microbiol* **44**: 184-188.

Karandashova, I.V. and Elanskaya, I.V. (2005). Genetic Control and Mechanisms of Salt and Hyperosmotic Stress Resistance in Cyanobacteria. *Russ J Genet* **41**: 1311-1321.

Katz, A., Kaback, HR. and Avron, M. (1986). Na^+/H^+ antiport in isolated plasma membrane vesicles from the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *FEBS Lett* **202**: 141-144.

Katz, A., Pick, U. and Avron, M. (1989). Characterization and reconstitution of the Na^+/H^+ antiporter from the plasma membrane of the halotolerant alga *Dunaliella*. *Biochim Biophys Acta* **983**: 9-14.

Katz, A., Bental, M., Degani, H. and Avron, M. (1991). In vivo pH regulation by a Na^+/H^+ antiporter in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* **96**: 110-115.

Katz, A. and Pick, U. (2001). Plasma membrane electron transport coupled to Na^+ extrusion in the halotolerant alga *Dunaliella*. *Biochim Biophys Acta* **1504**: 423-431.

Kawasaki, S., Borchert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. and Bohnert, HJ. (2001). Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* **13**: 889-905.

Kempf, B. and Bremer, E. (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**: 319-330.

Khemakhem, H., Elloumi, J., Moussa, M., Aleya, L. and Ayadi, H. (2010). The concept of ecological succession applied to phytoplankton over four consecutive years in five ponds featuring a salinity gradient. *Estuar Coast Shelf S* **88**: 33-44.

Khemakhem, H. (2012). Contribution à l'étude du fonctionnement écologique de la saline de Sfax: Analyse statistique et Modélisation. *Thèse de doctorat. Université de Sfax (Tunisie)*, 270 p.

Kingston, M.B. (2009). Growth and motility of the diatom *Cylindrotheca closterium*: Implications for commercial applications. *J N C Acad Sci* **125** (4): 138-142.

- Kirroliaa, A., Bishnoia, N.R. and Singhb, N. (2011).** Salinity as a factor affecting the physiological and biochemical traits of *Scenedesmus quadricauda*. *J Algal Biomass Utln* **2** (4): 28-34.
- Kirst, G.O. (1990).** Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* **41**: 21-53.
- Ko, J.H. and Lee, S.H. (1995).** Rôle of calcium in the osmoregulation under salt stress in *Dunaliella salina*. *J Plant Boil* **38**: 243-250.
- Kobbi-Rebai, R., Annabi-Trabelsi, N., Khemakhem, H., Ayadi, H. and Aleya, L. (2013).** Impacts of restoration of an uncontrolled phosphogypsum dumpsite on the seasonal distribution of abiotic variables, phytoplankton, copepods, and ciliates in a man-made solar saltern. *Environ Monit Assess* **185** (3): 2139-55.
- Koffi, K., Philippe, D.K., Marcel, K.A., Maryse, A.N., Kagoyire, K.A. and Adingra, A.A. (2009).** Seasonal Distribution of Phytoplankton in Grand-Lahou Lagoon (Côte d'Ivoire). *Eur J Sci Res* **26**: 329-341.
- Krause, G.H., Weis, E. (1991).** Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **42**: 313-349.
- Krinsky, N.I. and Yeum, K.J. (2003).** Carotenoid-radical interactions. *Biochem Biophys Res Commun* **305**: 754-760.
- Kromkamp, J.C. and Claquin, P. (2006).** Role of cell cycle in the metabolism of marine microalgae. *Algal cult analog Bloom Applicat* **1**: 385-406.
- Kuda, T., Tsunekawa, M., Hishi, T and Araki, Y. (2005).** Antioxidant properties of dried Kayamo-nori, a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Food Chem* **89**: 617-622.
- Kumar, M.S., Muralitharan, G. and Thajuddin, N. (2009).** Screening of a hypersaline cyanobacterium, *Phormidium tenue*, for the degradation of aromatic hydrocarbons: naphthalene and anthracene. *Biotechnol Lett* **31**: 1863-1866.
- Kûpper, F.C., Kolareg, B., Guern, J. and Potin, P. (2001).** Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*. *Plant Physiol* **125**: 278-291.



- Laloknam, S., Tanaka, K., Buaboocha, T., Waditee, R., Incharoensakdi, A., Hibino, T., Tanaka, Y. and Takabe, T. (2006).** Halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*

contains a betaine transporter active at alkaline pH and high salinity. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6018-6026.

Larsen, H. (1986). Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiol Lett* **39 (1-2)**: 3-7.

Leisinger, U., Ru fenacht, K., Zehnder, A.J.B. and Eggen, R.I.L. (1999). Structure of a glutathione peroxidase homologous gene involved in the oxidative stress response in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci* **149**: 139-149.

Legendre, L. and Legendre, P. (1979). Ecologie numérique 1. (Ed) p 260. Masson, Paris.

Leon, R. and Galvan, F. (1999). Interaction between saline stress and photoinhibition of photosynthesis in the freshwater green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. Implications for glycerol photoproduction. *Plant Physiol Biochem* **37**: 623-628.

Lers, A., Biener, Y. and Zamir, A. (1990). Photoinduction of massive β -carotene accumulation by the alga *Dunaliella bardawil*. Kinetics and dependence on gene activation. *Plant Physiol* **93**: 389-395.

Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F. and Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chem* **102**: 771-776.

Li, Z., Wakao, S., Fischer, B.B. and Niyogi, K.K. (2009). Sensing and responding to excess light. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 239-260.

Ligterink, C.J.W. and Hirt, H. (1999). MAP kinases in plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci* **55**: 204-213.

Lim, D.S.S., Douglas, M.S.V. and Smo, I.J.P. (2001). Diatoms and their relationship to environmental variables from lakes and ponds on Bathurst Island, Nunavut, Canadian High Arctic. *Hydrobiologia* **450**: 215-230.

Liska, A.J., Shevchenko, A., Pick, U. and Katz A. (2004). Enhanced Photosynthesis and Redox Energy Production Contribute to Salinity Tolerance in *Dunaliella* as Revealed by Homology-Based Proteomics. *Plant Physiol* **136**: 2806-2817.

Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-response gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1391-1406.

- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S. and Zhu, J.K. (2000).** The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 3735-40.
- Liu, X.D. and Shen, Y.G. (2004).** NaCl-induced phosphorylation of light harvesting chlorophyll a=b proteins in thylakoid membranes from the halotolerant green alga, *Dunaliella salina*. *FEBS Lett* **569**: 337-340.
- Liu, W., Au, D.W.T., Anderson, D.M., Lam, P.K.S. and Wu, R.S.S. (2007).** Effects of nutrients, salinity, pH and light: dark cycle on the production of reactive oxygen species in the alga *Chattonella marina*. *J Exp Mar Biol Ecol* **346**: 76-86.
- Lopes, V.R., Ramos, V., Martins, A., Sousa, A., Welker, M., Antunes, A. and Vasconcelos, V.M. (2012).** Phylogenetic, chemical and morphological diversity of cyanobacteria from Portuguese temperate estuaries. *Mar Environ Res* **73**: 7-16.
- Lopez-Flores, R., Boix, D., Badosa, A., Brucet, S. and Quintana, X.D. (2006).** Pigment composition and size distribution of phytoplankton in a confined Mediterranean salt marsh ecosystem. *Mar Biol* **149**: 1313-1324.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J., (1951).** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-75.
- Lynn, J., Rocco, R., and Mancinelli, L. (2001).** Life in extreme environments. *Nature* **409**: 1092-1101.
- Lyra, C., Hantula, J., Vainio, E., Rapala, J., Rouhiainen, L. and Sivonen, K. (1997).** Characterization of cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene. *Arch Microbiol* **168**: 176-184.
- Lu, C.M. and Zhang, J.H. (1999).** Effects of salt stress on PSII function and photoinhibition in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J Plant Physiol* **155**: 740-745.
- Lu, C. and Vonshak, A. (2002).** Effects of Salinity Stress on Photosystem II Function in Cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Physiol Plant* **114**: 405-413.



- Mackay, M.A., Horton, R.S. and Borowitzka, L.J. (1984).** Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **130**: 2177-2191.
- Mackay, M. and Norton, R.S. (1987).** ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Study of Biosynthesis of Glucosylglycerol by Cyanobacterium under Osmotic Stress, *J Gen Microbiol* **130**: 2177-2191.
- Madkour, F.F. and Gaballah, M.M. (2012).** Phytoplankton assemblage of a solar saltern in Port Fouad, Egypt. *Oceanologica* **54 (4)**: 687-700.
- Maeda, M. and Thompson, G.A. (1986).** On the mechanism of rapid plasma membrane and chloroplast envelope expansion in *Dunaliella salina* exposed to hypoosmotic shock. *J Cell Biol* **102**: 289-297.
- Mallick, N. and Mohn, F.H. (2000).** Reactive oxygen species: response of algal cells. *J Plant Physiol* **157**: 183-193.
- Mallick, N. and Mohn, F. H. (2003).** Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress response: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotox Environ Saf* **55**: 64-69.
- Mankiewics, J., Tarczynska, M., Walter, Z. and Zalewski, M., (2003).** Natural toxins from cyanobacteria. *Acta Biol Cracov Bot* **45**: 9-20.
- Mann, D.G. (1993).** Patterns of sexual reproduction in diatoms. *Hydrobiologia* **270**: 11-20.
- Mann, D.G., and Droop, S.J.M. (1996).** Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. *Hydrobiologia* **336**: 19-32.
- Mann, S. and Ozin, G.A. (1996).** Synthesis of inorganic materials with complex form. *Nature* **382**: 313-318.
- Margulis, L., Barghoorn, E.S., Ashendorf, D., Banerjee, S., Chase, D., Francis, S., Giovanonni, S. and Stolz, J. (1980).** The microbial community in layered sediments at Laguna Figueroa, Baja California, Mexico: Does it have Precambrian analogues? *Precamb Res* **11**: 93-123.
- Marin, K., Suzuki, I., Yamaguchi, K., Ribbeck, K., Yamamoto, H., Kanesaki, Y., Hagemann M. and Murata, N. (2003).** Identification of histidine kinases that act as sensors in the perception of salt stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9061-9066.

- Marin, K., Kanesaki, Y.U. and Los, D.A. (2004).** Gene Expression Profiling Reflects Physiological Processes in Salt Acclimation of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Plant Physiol* **136**: 3290-3300.
- Marin, B. and Melkonian, M. (2010).** Molecular phylogeny and classification of the Mamiellophyceae class. nov (Chlorophyta) based on sequence comparisons of the nuclear- and plastid-encoded rRNA operons. *Protist* **161**: 304-336.
- Marquardt, J. and Palinska, K.A., (2007).** Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Arch Microbiol* **187**: 397-413.
- Marques, S.C., Pardal, M.Â., Mendes, S. and Azeiteiro, U.M. (2011).** Using multitable techniques for assessing the temporal variability of species environment relationship in a copepod community from a temperate estuarine ecosystem. *J Exp Mar Biol Ecol* **405**: 59-67.
- Masood, A., Ahmad Shah, A., Zeeshan, M. and Abraham, G. (2006).** Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla* (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*). *Environ Exper Bot* **58**: 216-222.
- Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S. (2010).** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew Sust Energ Rev* **14**: 217-232.
- Maxwell, D.P., Laudénbach, D.E. and Huner N.P.A. (1995).** Redox Regulation of Light-Harvesting Complex II and cab mRNA Abundance in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* **109**: 787-795.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N. (2000).** Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J Exp Bot* **51**: 659-668.
- Medina, M., Collins, A. G., Silberman, J. D. and Sogin, M. L. (2001).** Evaluating hypotheses of basal animal phylogeny using complete sequences of large and small subunit rRNA. *PNAS* **98**: 9707-9712.
- Medlin, L. K. (1990).** Comparison of restriction endonuclease sites in the small subunit 16S-like rRNA gene from the majorgenera of the family Bacillariaceae. *Diatom Res* **5** : 63-71.
- Medlin, L.K., Elwood, H.J., Stickel, S. and Sogin, M.L. (1991).** Morphological and genetic variation within the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): evidence for a new species, *Skeletonema pseudocostatum*. *J Phycol* **27**: 514-524.
- Medlin, L. K., Cooper, A., Hill, C., Wrieden, S. and Wellbrock, U. (1995).** Phylogenetic position of the Chromista plastids based on small subunit rRNA coding regions. *Curr Genet* **28**: 560-565.

- Medlin, L. K., Kooistra, W. H. C. F., Gersonde, R. and Wellbrock, U. (1996).** Evolution of the Diatoms (Bacillariophyta). II. Nuclear-Encoded Small- Subunit rRNA Sequence Comparisons Confirm a Paraphyletic Origin for the Centric Diatoms. *Mol Biol Evol* **13** (1): 67-75.
- Medlin, L.K. (1997).** Can molecular techniques help define species limits? *Diatom* **13**: 19-23.
- Medlin, L.K., Groben, R. and Valentin, K. (1999).** Molecular tools for the study of marine microbial diversity. *N.E.R.C. (GR3/8139 and GR9/7159), E. C. (EHUX- MAST-PL92-0058, AIMS MAS3-CT97-0080, PICODIV EVK3-CT-1999-00021), and the G.G. BMBF (TEPS - 03F0161A).*
- Melis, A. (1999).** Photosystem II damage and repair cycle in chloroplast: what modulates the rate of photodamage *in vivo*. *Trends Plant Sci* **4**: 130-135.
- Melis, A. (2009).** Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Sci* **177**: 272-280.
- Mendes, R.L., Fernandes, H.L., Coelho, J.P., Reis, E.C., Cabral. J.M., Novais, J.M., Palavra, A.F. (1995).** Supercritical CO₂ extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chem* **53**: 99-103.
- Mendes, S., Fernandez-Gomez, M.J., Resende, P., Pereira, M.J., Galindo-Villardón, M.P. and Azeiteiro UM (2009).** Spatio-temporal structure of diatom assemblages in a temperate estuary. A STATICO analysis. *Estuar Coast Shelf S* **84**: 637-644.
- Mendoza, E.G., Matthijs, H.C.P., Schubert, H. and Mur, L.R. (2002).** Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlorella fusca* acclimated to constant and dynamic light conditions. *Photosynth Res* **74**: 303-315.
- Mendoza, H., de la Jara, A., Freijanes, K., Carmona, L., Ramos, A.A., Duarte, V.S. and Varela, J.C.S. (2008).** Characterization of *Dunaliella salina* strains by flow cytometry: a new approach to select carotenoid hyperproducing strains. *Electron J Biotechnol* **11** (4):1-13.
- Meyer, A., Todt, C., Mikkelsen, N. T. and Lieb, B. (2010).** Fast evolving 18S rRNA sequences from *Solenogastres* (Mollusca) resist standard PCR amplification and give new insights into mollusk substitution rate heterogeneity. *BMC Evol Biol* **10**: 70.
- Mishra, A., Mandoli, A. and Jha, B. (2008).** Physiological characterization and stress induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**: 1093-1101.
- Mikami, K., Kanesaki, Y., Suzuki, I., Murata, N. (2002).** The histidine kinase Hik33 perceives osmotic stress and cold stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* **46**: 905-915.

- Mittler, R. (2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410.
- Miyao, M. and Murata, N. (1983).** Partial disintegration and reconstitution of the photosynthetic oxygen-evolution system: binding of 24 kDa and 18 kDa polypeptides. *Biochim Biophys Acta* **725**: 87-93.
- Molitor, V., Erber, W. and Peschek, G.A. (1986).** Increased Levels of Cytochrome-Oxidase and Sodium-Proton Antiporter in the Plasma Membrane of *Anacystis nidulans* after Growth in Sodium-Enriched Media. *FEBS Lett* **204**: 251-256.
- Molitor, V., Kunter, O., Sleytr, U.B. and Peschek, G.A. (1990).** The Ultrastructure of Plasma and Thylacoid Membrane Vesicles from the Fresh Water Cyanobacterium *Anacystis nidulans* Adapted to Salinity. *Protoplasma* **157**: 112-119.
- Moll, R.A. (1977).** Phytoplankton in a Temperate-Zone Salt Marsh: Net Production and Exchanges with Coastal Waters *Mar Biol* **42**:109-118.
- Moller, IM. (2001).** Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 561-591.
- Morelli, E. and Scarano, G. (2004).** Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Sci* **167**: 289-296.
- Moreno, J.J. and Mitjavila, M.T. (2003).** The degree of unsaturation of dietary fatty acids and the development of atherosclerosis (Review). *J. Nutr. Biochem.* **14**: 182-195.
- Mozaffarian, D. and Wu, J.H.Y. (2011).** Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* **58**: 2047-2067.
- Moro, C. V., Crouzet, O., Rasconi, S., Thouvenot, A., Coffe, G., Batisson, I. and Bohatier, J. (2009).** New Design Strategy for Development of Specific Primer Sets for PCR-Based Detection of Chlorophyceae and Bacillariophyceae in Environmental Samples. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5729-5733.
- Montejano, G. and León-Tejera. H. (2002).** Reproduction and baeocyte formation in two species of *Dermocarpella* (Cyanophyceae). *Eur J Phycol* **37**: 323-327.
- Montoya, H. (2009).** Algal and Cyanobacterial Saline Biofilms of the Grande Coastal Lagoon, Lima, Peru. *Nat Resour Renv Iss* **15 (23)**: 127-134.
- Morse, D.E. (1999).** Silicon biotechnology: harnessing biological silica production to construct new materials. *Trends Biotechnol* **17**: 230-32.

- Moulton, T. P., Sommer, T. R., Burford M. A. and Borowitzka L. J. (1987).** Competition between *Dunaliella* species at high salinity. *Hydrobiologia* **151** (152): 107-116.
- Msagati, T.A.M. Siame, B.M. Shushu, D.D. (2006).** Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat Toxicol* **78**: 382-397.
- Müller, P., Li, X.P. and Niyogi. K.K. (2001).** Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol* **125**: 1558-1566.
- Munns., R. and Tester., M. (2008).** Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 651-81.
- Murata, N. and Miyao, M. (1985).** Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Trends Biochem Sci* **10**: 122-124.
- Murata, N., Takahashi S., Nishiyama, Y. and Allakhverdiev. S.I. (2007).** Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim Biophys Acta* **1767**: 414-421.
- Murik, O. and Kaplan, A. (2009).** Paradoxically, prior acquisition of antioxidant activity enhances oxidative stress-induced cell death. *Environ Microbiol* **11**(9): 2301-2309.



- Nagasathya, A. and Thajuddin, N. (2008).** Cyanobacterial diversity in the hypersaline environment of the saltpans of southeastern coast of India. *Asian J Plant Sci* **7**: 473-478.
- Nakamura, C., Burgess, J. G., Sode, K. and Matsunaga, T. (1995).** An iron regulated gene, *magA*, encoding an iron transport protein of *Magnetospirillum* sp. strain AMB-1. *J Biol Chem* **270**: 28392-28396.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981).** Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* **22**: 867-880.
- Neale P.J. and Melis A. (1989).** Salinity-stress enhances photoinhibition of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Plant Physiol* **134**: 619-622.
- Neidhardt, J., Benemann, J.R. and Zhang L, Melis, A. (1998).** Photosystem-II repair and chloroplast recovery from irradiance stress: relationship between chronic photoinhibition, light-harvesting chlorophyll antenna size and photosynthetic productivity in *Dunaliella salina* (green algae). *Photosynth Res* **56**: 175-184.
- Neilan, B., A., Jacobs, D. and Goodman, A. E. (1995).** Genetic Diversity and Phylogeny of Toxic Cyanobacteria Determined by DNA Polymorphisms within the Phycocyanin Locus. *Appl Environ Microbiol* **61**(11): 3875-3883.
- Netondo, G.W., Onyango, J.C. and Beck, E. (2004).** Sorghum and salinity: II. Gas exchange and chlorophyll fluorescence of sorghum under salt stress. *Crop Sci* **44**: 806-811.

Nguyen-Deroche, TN. (2008). Effets du cuivre et du zinc sur la photosynthèse et le métabolisme d'une cyanobactérie et de diatomées marines du littoral vietnamien; comparaison avec des espèces de la côte atlantique française. *Thèse de doctorat. Université du Maine (France)* 175p.

Nishiyama, Y., Los, D.A., and Murata, N. (1999). PsbU, a Protein Associated with Photosystem II, Is Required for the Acquisition of Cellular Thermotolerance in *Synechococcus* species PCC 7002. *Plant Physiol* **120**: 301-308.

Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I., Yamamoto, H. Hayashi, H. and Murata, N. (2004). Singlet oxygen inhibits the repair of photosystem II by suppressing the translation elongation of the D1 protein in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemistry* **43**: 11321-11330.

Nishiyama, Y. Allakhverdiev, S.I. and Murata, N. (2006). A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1757** : 742-749.

Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., and Pardo, J.M. (1995). Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol* **109**: 735-742.

Novikova, G. V., Moshkov, I. E. and Los. D. A. (2007). Protein Sensors and Transducers of Cold and Osmotic Stress in Cyanobacteria and Plants. *Mol Biol* **41**: 427-437.

Nymark, M., Valle, K.C., Brembu, T., Hancke, K., Winge, P., Andresen, K., Johnsen, G. and Bones, A.T. (2009). An Integrated Analysis of Molecular Acclimation to High Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS. ONE* **4(11)**: 1-14.

Nübel, U., Garcia-Pichel, F, Clavero, E. and Muyzer, G. (2000). Matching molecular diversity and ecophysiology of benthic cyanobacteria and diatoms in communities along a salinity gradient. *Environ Microbiol* **2 (2)**: 217-226.



Olofsson, M., Lamela, T., Nilsson, E, Bergé, J.P., del Pino, V., Uronen, P. and Legrand, C. (2012). Seasonal variation of lipids and fatty acids of the microalgae *Nannochloropsis oculata* grown in outdoor large-scale photobioreactors. *Energy* **5**:1577-1592.

Olmos, J., Paniagua, J. and Contreras, R. (2000). Molecular identification of *Dunaliella* sp. utilizing the 18S rDNA gene. *Lett Appl Microbiol* **30**: 80-84.

- Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua, M.J. and Contreras, R. (2009).** DNA fingerprinting differentiation between β carotene hyperproducer strains of *Dunaliella* from around the world. *Saline Systems* **5**: 1-5.
- Osmond, C.B. (1994).** What is photoinhibition? Some insights from sun and shade plants. In: Baker NR and Bowyer NR (eds) Photoinhibition of Photosynthesis: From the Molecular Mechanisms to the Field. *BIOS Scientific Publishing, Oxford*.
- Oren, A. (2002).** Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**: 56-63.
- Oren, A. (2005).** A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems* **1**:2 doi:10.1186/1746-1448-1-2.
- Oren, A. (2009).** Saltern evaporation ponds as model systems for the study of primary production processes under hypersaline conditions. *Aquat Microb Ecol* **56**: 193-204.
- Orcutt, D.M. and Patterson, G.W. (1974).** Effect of light intensity upon lipid composition of *Nitzschia closterium* (*Cylindrotheca fusiformis*). *Lipids* **9**: 1000-1003.
- Orsini, L., Procaccini, G., Sarno, D and Montresor, M. (2004).** Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Mar Ecol Prog Ser* **271**: 87-98.
- Ort, R.D. and Baker, N.R. (2002).** A photoprotective role for O₂ as an alternative electronic sink in photosynthesis? *Curr Opin Plant Biol* **5**:193-98.
- Ortega-Mayagoitia, E., Rojo, C. and Rodrigo, M.A. (2003).** Controlling factors of phytoplankton assemblages in wetlands: an experimental approach. *Hydrobiologia* **502**: 177-186.
- Ouvrard, D., Campbell, B. C., Bourgoin, T. and Chan, K. L. (2000).** 18S rRNA secondary structure and phylogenetic position of Peloridiidae (Insecta, Hemiptera). *Mol Phylogenet Evol* **16**: 403-417.
- Ozturk, Z.N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, C.B., Galbraith, D.W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. and Bohnert, H.J. (2002).** Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and saltstressed barley. *Plant Mol Biol* **48**: 551-573.



- Padan, E., Venturi, M., Gerchman, Y. and Dover, N. (2001).** Na^+/H^+ antiporters. *Biochem Biophys Acta* **1505**: 144-157.
- Paithoonrangsarid, K., Shoumskaya, M.A., Kanesaki, Y., Satoh, S., Tabata, S., Los, D.A., Vladislav V. Zinchenko, V.V, Hayashi, H., Morakot Tanticharoen, M., Suzuki, I. and Murata, N. (2004).** Five Histidine Kinases Perceive Osmotic Stress and Regulate Distinct Sets of Genes in *Synechocystis*. *J Biol Chem* **279** (51): 53078-53086.
- Palenik, B. and Haselkorn. R. (1992).** Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll-containing prokaryotes. *Nature* **355**: 265-267.
- Palinska, K.A. and Marquardt, J. (2008).** Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales). *Arch Microbiol* **189**: 325-335.
- Papageorgiou, G. and Govindjee. G. (1968).** Light induced changes in the fluorescence yield of chlorophyll *a* in vivo *Anacystis nidulans*. *Biophys J* **8**: 1299-1315.
- Papageorgiou, G.C. (1996).** The photosynthesis of cyanobacteria (blue bacteria) from the perspective of signal analysis of chlorophyll *a* fluorescence. *J Sci Ind Res* **55**: 596-617.
- Prásil, O., Adir, N. and Ohad, I. (1992).** Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery process, in: J. Barber (Ed.), *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*, vol. 11, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. p295-348.
- Parkinson, J. and Gordon., R. (1999).** Beyond micromachining: the potential of diatoms. *Trends Biotechnol* **17**: 190-96.
- Parmar, A., Singh, N.K., Pandey, A., Gnansounou, E. and Madamwar, D. (2011).** Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresour Technol* **102**:10163-10172.
- Passaquet, C., Thomas, J.C., Caron, L., Hauswirth, N., Puel, F. and Berkuloff, C. (1991).** Light-harvesting complexes of brown algae Biochemical characterization and immunological relationships. *FEBS Lett* **280** (1): 21-26.
- Pereira, S.L., Leonard, A.E., Huang, Y.S., Chuang, L.T. and Mukerji, P. (2004).** Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the omega3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid. *Biochem J* **384**: 357-366.
- Perrine, Z., Negi, S. and Sayre, R.T. (2012).** Optimization of photosynthetic light energy utilization by microalgae. *Algal Research* **1**: 134-142.

- Premanandh, J., Priya, B., Teneva, I., Dzhambazov, B., Prabakaran, D. and Uma, L. (2006).** Molecular Characterization of Marine Cyanobacteria from the Indian Subcontinent Deduced from Sequence Analysis of the Phycocyanin Operon (*cpcB-IGS-cpcA*) and 16S-23S ITS Region. *J Microbiol* **4** (6): 607-616.
- Pick, U., Karni, L. and Avron, M. (1986).** Determination of ion content and ion fluxes in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* **81**: 92-96.
- Pick, U. (1992).** ATPases and ion transport in *Dunaliella*. In: Avron M, Ben-Amotz A, (editors). *Dunaliella; physiology, biochemistry and biotechnology*. New-York: CRC Press. pp 63-97.
- Pisal, D.S. and Lele, SS. (2005).** Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian. J. Biotechno* **4**: 476-483.
- Poolman, B. and Glaasker, E. (1998).** Regulation of Compatible Solute Accumulation in Bacteria. *Mol Microbiol* **29**: 397-407.
- Popva, L., Balnokin, Y., Dietz, K.J. and Gimmmler, H. (1999).** Characterisation of phosphorylated intermediates synthesized during the catalytic cycle of the sodium adenosine triphosphate in the plasma membrane of the marine unicellular alga *Tetraselmis (Platymonas) viridis*. *J Plant Physiol* **155**: 302-309.
- Potapova, M. and Charles, D.F. (2007).** Diatom metrics for monitoring eutrophication in rivers of the United States. *Ecol Indicat* **7**: 48-70.
- Powles, S.B. and Critchley, C. (1980).** Effect of light intensity during the growth on photoinhibition of intact attached bean leaflets. *Plant Physiol* **65**: 1181-1187.
- Pramateftaki, P.V., Lanaridis, P. and Typas, M.A. (2000).** Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J Appl Microbiol* **89**: 236-248.
- Premanandh, J., Priya, B, Teneva, I, Dzhambazov, B, Prabakaran, D. and Uma, L. (2006).** Molecular Characterization of Marine Cyanobacteria from the Indian Subcontinent Deduced from Sequence Analysis of the Phycocyanin Operon (*cpcB-IGS-cpcA*) and 16S-23S ITS Region. *J Microbiol* 607-616.



Qiu, Q. S., Guo, Y., Dietrich, M. A., Schumaker, K. S., and Zhu, J.K. (2002). Regulation of SOS1, a plasma membrane Na^+/H^+ exchanger in *Arabidopsis thaliana*, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 8436-8441.

Qiu, B., Zhang, A. and Liu, Z. (2003). Oxidative stress in *Nostoc flagelliforme* subjected to desiccation and effects of exogenous oxidants on its photosynthetic recovery. *J Appl Phycol* **15**: 445-450.

Quintero, F. J., Ohta, M., Shi, H., Zhu, J.K. and Pardo, J.M. (2002). Reconstitution in yeast of the *Arabidopsis* SOS signaling pathway for Na^+ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 9061-9066.



Rai, L.C. and Gaur, J. P. (2001). Algal adaptation to environmental stresses: physiological, biochemical and molecular mechanisms. *Berlin: Springer*, 324-361.

Raja R, Iswarya SH, Balasubramanyam D. and Rengasamy R. (2007). PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbiol Res* **162**: 168-176.

Ramírez, F., Abdennadher, A., Sanpera, C., Jover, L., Wassenaar, L.I. and Hobson, K.A. (2001). Assessing waterbird habitat use in coastal evaporative systems using stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ and δD) as environmental tracers. *Estuat Coast Shelf S* **92**: 217-222.

Rao, A.R., Sarada, R., Baskaran, V. and Ravishankar, G.A. (2006). Antioxidant activity of *Botryococcus braunii* extract elucidated in vitro models. *J Agric Food Chem* **54**: 4593-4599.

Rech, M., Mouget, J.L. and Tremblin, G. (2003). Modification of the Hansatech FMS fluorometer to facilitate measurements with microalgal cultures. *Aquat Bot* **77**: 71-80.

Reed, R.H. and Stewart, W.D.P. (1985). Osmotic Adjustment and Organic Solute Accumulation in Unicellular Cyanobacteria from Freshwater and Marine Habitats. *Mar Biol* (Berlin) **88**: 1-9.

Renaud, S.M., Parry, D.L., Thinh, L.V., Kuo, C., Padovan, A. and Sammy, N. (1991). Effect of light intensity on the proximate biochemical and fatty-acid composition of *Isochrysis* sp. and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. *J Appl Phycol* **3**: 43-53.

- Rengasamy, P. (2002).** Transient salinity and subsoil constraints to dry land farming in Australian sodic soils: an overview. *Aust J Exp Agric* **42**: 351-61.
- Resende, P., Azeiteiro, U. and Pereira, M.J. (2005).** Diatom ecological preferences in a shallow temperate estuary (Ria de Aveiro, Western Portugal). *Hydrobiologia* **544**: 77-88.
- Ricard, M. (1987).** Atlas du phytoplancton marin Volume 2 : Diatomophycées. Éditions du centre national de la recherche scientifique, Paris. *Ed p142*.
- Rijstenbil, J. W., Derksen, J. W. M., Gerringa, L. J. A., Poortvliet, T. C. W., See, A., van den Berg, M., Van Drie, J., Wijnholds, J. A. (1994).** Oxidative stress induced by copper: defense and damage in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, growth in continuous cultures with high and low zinc levels. *Mar Biol* **119**: 583-590.
- Rijstenbil, J. W. (2002).** Assessment of oxidative stress in the planktonic diatom *Thalassiosira pseudonana* in response to UVA and UVB radiation. *J Plankton Res* **24**:1277-88.
- Rijstenbil, J.W. (2003).** Effects of UVB radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defence of the marine diatom *Cylindrotheca closterium*. *Mar Ecol Prog Ser* **254**: 37-48.
- Rijstenbil, J. W. (2005).** UV- and salinity-induced oxidative effects in the marine diatom *Cylindrotheca closterium* during simulated emersion. *Mar Biol* **147**: 1063-1073.
- Riyahi, J., Houazine, Y., Akallal, R., Mouradi, A., Creach, A., Givernaud, T. and Mouradi, A. (2007).** Influence des nitrates, de la salinité et du stress lumineux sur la teneur en acides gras et en β - carotène de *Dunaliella salina*. *Bull Soc Pharm Bordeaux* **146**: 235-250.
- Robarts, R.D. and Zohary, T. (1987).** Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth-rates of bloom-forming cyanobacteria. *Z J Mar Freshw Res* **21**: 391-399.
- Rocha, J.M.S., Garcia, J.E.C. and Henriques, M.H.F. (2003).** Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomol Eng* **20**: 237-242.
- Rochaix, J.D. (2002).** *Chlamydomonas*, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes. *FEBS Lett* **529**: 34-38.
- Rochaix, J.D. (2007).** Role of thylakoid protein kinases in photosynthetic acclimation. *FEBS Lett* **581**: 2768-2775.
- Roger, P.A. and Reynaud, P.A. (1977).** Les méthodes d'isolement et de purification des Cyanophycées. *Sér Biol* **12**: 121-128.

Rontein, D., Basset, G. and Hanson, A. D. (2002). Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Metab Eng* **4**: 49-56.

Roux, S.J. and Serlin, B.S. (1987). Cellular mechanisms controlling light stimulated gravitropism: Role of calcium. *Crit Rev Plant Sci* **5**: 205-236.

S

Saier, M.H.J. (2000). A functional phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 354-411.

Salguero, A., de la Morena, B., Vigar, J., Vega, J.M., Vilchez, C. and Leon, R. (2003). Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomol Eng* **20**: 249-253.

Salm, C.R., Saros, J.E., Martin, C.S. and Erickson, J.M. (2009). Patterns of seasonal phytoplankton distribution in prairie saline lakes of the northern Great Plains (U.S.A.). *Saline Systems* **5**(1): 1746-1448.

Santiago-Vázquez, L.Z. and Jacobs, R.S. (2005). Comparison of fatty acid composition of cell homogenates and isolated chloroplasts in *Acetabularia crenulata* (Lamouroux). *Z Naturforsch* **60**: 757-763.

Saros, J.E. and Fritz, S.C. (2000). Nutrients, ionic concentration, and diatom distribution in saline lakes. *J Paleolimn* **23**: 449-453.

Sournia, A. (1986). Atlas du phytoplancton marin Volume 1 : Cyanophycées, dictyochophycées, dinophycées et raphidophycées. Éditions du centre national de la recherche scientifique, Paris. Ed p124.

Scala, S. and Bowler, C. (2001). Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1666-1673.

Schwartz, SH., Black, TA., Jager, K., Panoff, JM. and Wolk, CP. (1998). Regulation of an osmoticum-responsive gene in *Anabena* sp. Strain PCC7120. *J Bacteriol* **180**: 6332-6337.

SCOR-UNESCO. (1966). Determination of photosynthetic pigments in sea-water. Report of SCOR-UNESCO Working Group 17, UNESCO *Monographs on oceanographic methodology* **1**, p69.

- Schreiber, U., Schliwa, U. and Bilger, W. (1986).** Continuous recording of photochemical and non photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* **10**: 51-62.
- Schubert, H. and Hagemann, M. (1990).** Salt Effect on 77K Fluorescence and Photosynthesis in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. (PCC 6803). *FEMS Microbiol Lett* **71**: 169-172.
- Schubert, H., Fulda, S., and Hagemann, M. (1993).** Effects of Adaptation to Different Salt Concentrations on Photosynthesis and Pigmentation of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J Plant Physiol* **142**: 291-295.
- Segal, R.D., Waite, A.M. and Hamilton, D.P., (2006).** Transition from planktonic to benthic algal dominance along a salinity gradient. *Hydrobiol* **556**: 119-135.
- Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A. and Sakurai, T. (2002).** Monitoring the expression pattern of around 7, 000 Arabidopsis genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct Integr Genomics* **2**: 282-291.
- Serrano, R., Mulet, JM., Rios, G., Marquez, J.A., Delarriona, IF., Leube, MP., Mendizabal, I., Pascualahir, A., Proft, M., Ros, R. and Montesinos, C. (1999).** A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *J Exp Bot* **50**: 1023-1036.
- Serrano, R. and Navarro, A.R. (2001).** Ion Homeostasis during Salt Stress in Plants. *Curr. Opin. Cell Biol* **13**: 399-404.
- Shannon, C.E., Weaver, G. (1949).** The Mathematical Theory of Communication. *University of Illinois Press, Urbana, Chicago, IL*, 118 pp.
- Sharma, P.K. and Hall, D.O. (1991).** Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum. *J Plant Physiol* **138**: 614-619.
- Shapiguzov, A., Lyukevich, A.A. and Allakhverdiev, S.I. (2005).** Osmotic Shrinkage of Cells of *Synechocystis* sp. PCC 6803 by Water Efflux via Aquaporins Regulates Osmostress-Inducible Gene Expression. *Microbiol* **151**: 447-455.
- Shen, J.R., Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1992).** Stoichiometric association of extrinsic cytochrome *c*550 and 12 kDa protein with a highly purified oxygen-evolving photosystem II core complex from *Synechococcus vulcanus*. *FEBS Lett* **301**: 145-149.
- Sherwood, JE., Stagnitti, F., Kokkinn, M.J., and Williams W.D. (1992).** A standard table for predicting equilibrium dissolved oxygen concentrations in salt lakes dominated by sodium chloride. *Int J Salt Lake Res.* **1**: 1-6.

- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C and Zhu, J.K. (2000).** The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6896-6901.
- Shi, H., Lee, B.H., Wu, S.J. And Zhu, J.K. (2003).** Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* **21**: 81-85.
- Shifrin, N.S. and Chisholm, S.W. (1981).** Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light-dark cycles. *J Phycol* **17**: 374-384.
- Shirkey, B., Kovarcik, D.P., Wright, D.J., Wilmoth, G., Prickett, T.F., Helm, R.F., Gregory, E.M. and Potts, M. (2000).** Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant sodF mRNA in *Nostoc commune* (cyanobacteria) after years of desiccation. *J Bact* **182**: 189-197.
- Shono, M., Hara, Y., Wada, M. and Fuiji, T. (1996).** A sodium pump in the plasma membrane of the marine alga *Heterisigma akasiwo*. *Plant Cell Physiol* **37**: 385-388.
- Sigaud, T. C. S. and Aidar, E. (1993).** Salinity and temperature effects on the growth and chlorophyll-a content of some planktonic algae. *Bolm Inst Oceanogr* **41(1/2)**: 95-103.
- Siegesmund, M.A, Johansen, J.R., Karsten, U. and Friedl, T. (2008).** *Coleofasciculus* gen. nov. (Cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *Microcoleus* Gomont. *J Phycol* **44**: 1572-1585.
- Simionato, D., Sforza, E., Corteggiani, C.E., Bertucco, A., Giacometti, G.M. and Morosinotto, T. (2011).** Acclimation of *Nannochloropsis gaditana* to different illumination regimes: Effects on lipids accumulation. *Bioresour Technol* **102**: 6026-6032.
- Simopoulos, A.P. and Cleland, L.G. (2003).** Importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *World Rev Nutr Diet* **92**:1-152.
- Sinha, R.P. and Häder, D.P. (1996).** Response of a Rice Field Cyanobacterium *Anabaena* sp. to Physiological Stressors. *Environ Exp Bot* **36**: 147-155.
- Smetacek, V. (2001).** A watery arms race. *Nature* **411**:745.
- Smith, F.A. and Walker, N.A. (1989).** Transport of potassium in chara australis : a symport with sodium. *J Membr Boil* **108**: 125-137.
- Smirnoff., N and Cumbes., Q.J. (1989).** Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057-1060.
- Salguero, A., de la Morena, B., Vigara, J., Vega, J.M. Vilchez, C. and León, R. (2003).** Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomol Eng* **20**: 249-253.

- Shoumskaya, M.A., Paithoonrangsarid, K., Kanesaki, Y., Los, D.A., Zinchenko, V.V., Tanticharoen, M., Suzuki, I. and Murata, N. (2005).** Identical Hik-Rre systems are involved in perception and transduction of salt signals and hyperosmotic signals but regulate the expression of individual genes to different extents in *Synechocystis*. *J Biol Chem* **280**: 21531-21538.
- Sforza, E., Simionato, D., Giacometti, G.M., Bertucco, A and Morosinotto, T. (2012).** Adjusted light and dark cycles can optimize photosynthetic efficiency in algae growing in photobioreactors. *PLoS ONE* **7(6)**: e38975. doi:10.1371/journal.pone.0038975.
- Solovchenko, A., Khozin-Goldberg, I., Recht, L. and Boussiba, S. (2011).** Stress-induced changes in optical properties, pigment and fatty acid content of *Nannochloropsis* sp.: implications for non-destructive assay of total fatty acids. *Mar Biotechnol* **13**: 527-535.
- Sonnenberg, R., Nolte, A. W. and Tautz, D. (2007).** An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use in species identification. *Front Zool* **4**: 1-12.
- Southworth, T. W., A. A. Guffanti, A. Moir, and T. A. Krulwich. (2001).** GerN, an endospore germination protein of *Bacillus cereus*, is an $\text{Na}^+/\text{H}^+_{\text{K}^+}$ antiporter. *J. Bacteriol.* **183**: 5896-5903.
- Speziale, B. J., Schreiner, S. P., Giammatteo., P. A. and Scxhindler, J. E. (1984).** Comparison of N, N-dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, and acetone for extraction of phytoplankton chlorophyll. *Can. J Fish Aqua Sci* **41**: 1519-1522.
- Stadnichuk, I.N. Yanyushin, M.F. Bernát, G., Zlenko, D.V. Krasilnikov, P.M. Lukashev, E.P., Maksimov, E.G. and Paschenko, V. Z. (2013).** Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter LCM from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 detected in vivo and in vitro. *J Photoch Photobio B* **125**: 137-145.
- Stamatakis, K., Ladas, N.P., Alygizakizorba, A., Papageorgiou, G.C. (1999).** Sodium chloride-induced volume changes of freshwater cyanobacterium *synechococcus* sp. PCC 7942 cells can be probed by chlorophyll a fluorescence. *Arch Biochem Biophys* **370**: 240-249.
- Stephens, D.W. and Gillespie, D.M. (1976).** Phytoplankton production in the Great Salt Lake, Utah, and a laboratory study of algal response to enrichment. *Limnol Oceanogr* **21 (1)**: 74-87.
- Stephenson, A.L., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A. And Smith, A.G. (2010).** Influence of nitrogen limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels* **1**: 47-58.

- Sterner, R.W., Andersen, T., Elser, J.J., Hessen, D.O., Hood, J.M., McCauley, E., Urabe, J. (2008).** Scale-dependent carbon: nitrogen: phosphorus seston stoichiometry in marine and freshwaters. *Limnol Oceanogr* **53**(3): 1169-1180.
- Stewart, A.C., Siczkowski, M. and Ljungberg, U. (1985).** Glycerol stabilizes oxygen evolution and maintains binding of a 9 kDa polypeptide in photosystem II particles from the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. *FEBS Lett* **193**: 175-179.
- Strain, H.H., Manning, W.M. and Hardin., G. (1943).** Chlorophyllc (chlorofucine) of diatoms and *dinoflagellates*. *J Biol Chem* **148**: 655-668.
- Sylvestre, F., Beck-Eichler, B., Duleba, W. and Debenay, J.P. (2001).** Modern benthic diatom distribution in a hypersaline coastal lagoon: the Lagoa de Araruama (R.J.), Brazil. *Hydrobiologia* **443**: 213-231.
- Sugimoto, M. and Sakamoto, W. (1997).** Putative phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress. *Genes Genet Syst* **72**: 311-316.
- Sukenik, A., Carmeli, Y. and Berner, T. (1989).** Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J Psychol* **25** : 686-692.
- Sukenik, A. and Carmeli, Y. (1990).** Lipid synthesis and fatty acid composition in *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae) grown in a light-dark cycle. *J Phycol* **26**: 463-469.
- Sullivan, C.W. and Volcani, B.E. (1974).** Synergistically stimulated (Na^+ , K^+)-adenosine triphosphatase from plasma membrane of a marine diatom. *Proc Natl Acad Sci USA* **71**: 4376-4380.
- Sultana, N., Ikeda, T. and Itoh, R. (1999).** Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environ Exp Bot* **42**: 211-220.
- Sung S.M., Hsu, Y.T., Hsu Y.T., Wu, T.M. and Lee, T.M. (2009).** Hypersalinity and Hydrogen Peroxide Upregulation of Gene Expression of Antioxidant Enzymes in *Ulva fasciata* Against Oxidative Stress. *Mar Biotechnol* **11**: 199-209.
- Sushchik, N.N., Kalacheva, G.S., Zhila, N.O., Gladyshev, M.I. and Volova, T.G. (2003).** A temperature dependence of the intra- and extracellular fatty acid composition of green algae and cyanobacterium. *Russ J Plant Physiol* **50**: 374-380.
- Suzukit, R. and Ishimaru, T. (1990).** An Improved Method for the Determination of PhytoplanktonChlorophyll using N, N-Dimethylformamide. *J Oceanol Soc Japan* **46**: 190-194.

Suzuki, I., Kanesaki, Y., Mikami, K., Kanehisa M. and Murata N. (2001). Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. *Mol Microbiol* **40**(1): 235-244.



Takabe, T., Incharoensakdi, A., Arakawa, K. and Yokota, S. (1988). CO₂ fixation rate and RuBisCO content increase in the halotolerant cyanobacterium, *Aphanothece halophytica*, grown in high salinities. *Plant Physiol* **88**: 1120-1124.

Tammam, A.A., Fakhry, E.M. and El-Sheekh, M. (2011). Effect of salt stress on antioxidant system and the metabolism of the reactive oxygen species in *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta*. *Afr. J Biotechnol.***10**(19): 3795-3808.

Tani, K., Watanabe, T., Matsuda, H., Nasu, M., and Kondo, M. (1996). Cloning and sequencing of the spore germination gene of *Bacillus megaterium* ATCC 12872: similarities to the NaH-antiporter gene of *Enterococcus hirae*. *Microbiol Immunol* **40**: 99-105.

Tao, N.G., Hu, Z.Y., Liu, Q., Xu, J., Cheng, Y.J., Guo, L.L., Guo, WW. and Deng, X.X. (2007). Expression of phytene synthase gene (Psy) is enhanced during fruit ripening of Cara Cara navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Rep* **26**: 837-843.

Tang D, Shi S, Li D, Hu C, Liu Y (2007). Physiological and biochemical responses of *Scytonema javanicum* (cyanobacterium) to salt stress. *J Arid Environ* **71**: 312-320.

Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., Wit, D.W. and Wilmotte A. (2003). Cyanobacterial Diversity in Natural and Artificial Microbial Mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a Morphological and Molecular Approach. *Appl Environ Microbiol* **69** : 5157-5169.

Tawfiq, A.S., Al-Musallam, L., Al-Shimmari, J and Dias, P. (1999). Optimum production conditions for different high-quality marine algae. *Hydrobiologia* **403**: 97-107.

Taylor, C.B. (1996). Control of cyclic carotenoid biosynthesis: no lutein, no problem. *Plant Cell* **8**: 1447-1450.

Thackray, P. D., Behravan, J., Southworth, T. W. and Moir, A. (2001). GerN, an antiporter homologue important in germination of *Bacillus cereus* endospores. *J Bacteriol***183**: 476-482.

Thiery, A. and Puente, L. (2002). Crustacean assemblage and environmental characteristics of a man-made solar saltwork in southern France, with emphasis an anostracan (Brachiopoda) population dynamics, *Hydrobiologia* **486**: 191-200.

Thioulouse, J. and Chessel, D. (1987). Les analyses multitableaux en écologie factorielle. *Acta Oecol- OEc. Gener* **8** (4): 463-480.

- Thioulouse, J., Simier, M. and Chessel, D. (2004).** Simultaneous analysis of a sequence of paired ecological tables. *Ecology* **85**: 272-283.
- Thioulouse, J. (2011).** Simultaneous analysis of a sequence of paired ecological tables: A comparison of several methods. *Ann Appl Stat* **5 (4)**: 2300-2325.
- Thomas, S.P. and Apte, S.K. (1984).** Sodium Requirement and Metabolism in Nitrogen-Fixing Cyanobacteria. *J Biosci* **6**: 771-794.
- Tomas, C.R., Hasle, G.R., Syvertsen, E.E., Steidinger, K.A. and Tangen A. (1996).** Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. *Elsevier London*, 5-361.
- Thompson, P.A., Guo, M. and Harrison, P.J. (1993).** The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional value for larvae of the Pacific Oyster (*Cassostrea gigas*). *Mar Biol* **117**: 259-268.
- Torrecilla, I., Leganés, F., Bonilla, I., and Fernández- Piñas, F. (2001).** Calcium Transients in Response to Salinity and Osmotic Stress in the Nitrogen-Fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120, Expressing Cytosolic Aquaequorin, *Plant Cell Environ* **24**: 641-450.
- Toumi, N., Ayadi, H., Abid, O., Carrias, J.F., Sime-Ngando, T., Boukhris, M. and Bouain, A. (2005).** Zooplankton distribution in four ponds of different salinity: a seasonal study in the solar salterns of Sfax (Tunisia). *Hydrobiologia* **534**: 1-9.
- Treguer, P., Nelson, D.M., Van, Bennekom, A.J., DeMaster, D.J. and Leynaert, A. (1995).** The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science* **268**: 375-79.
- Trigui, H., Masmoudi, S., Brochier-Armanet, C., Maalej, S. and Dukan, S. (2011).** Characterization of *Halorubrum sfaxense* sp. nov., a New Halophilic Archaeon Isolated from the Solar Saltern of Sfax in Tunisia. *Int J Microbiol* doi:10.1155/2011/240191
- Tsao, R. and Deng, Z. (2004).** Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J Chromatogr* **812**: 85-99.
- Tsukahara, K., Sawayama, S., Yagishita, T. and Ogi, T. (1999).** Effect of Ca^{2+} channel blockers on glycerol levels in *Dunaliella tertiolecta* under hypoosmotic stress. *J Biotechnol* **70**: 223-225.

U

Uthermöhl, H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt Int Ver Limnol* **9**: 1-38.

Utsugi, J., Inaba, K., Kuroda, T., Tsuda, M. and Tsuchiya, T. (1998). Cloning and sequencing of a novel Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys Acta* **1398**: 330-334.

V

Vadrucci, M.R., Cabrini, M. and Basset, A. (2007). Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion. *Transit Waters Bull* **2**: 83-102.

Van Dam, H., Mertens, A. and Sinkeldam, J. (1994). A coded checklist and ecological indicator values of fresh water diatoms from the Netherlands. *Neth J Aquat Ecol* **28**: 117-133.

Van Den Hoek, C., Mann D.G. and Johns, H.M. (1997). Algae: An Introduction to Phycology. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Vanormelingen, P., Chepurnov, V.A., Mann, D.G., Cousin, S. and Vyverman, W. (2007). Congruence of morphological, reproductive and ITS rDNA sequence data in some Australasian *Eunotia bilunaris* (Bacillariophyta). *Eur J Phycol* **42**: 61-79.

Vanormelingen, P., Chepurnov, V.A., Mann, D.G., Sabbe, K and Vyverman, W. (2008) Genetic divergence and reproductive barriers among morphologically heterogeneous sympatric clones of *Eunotia bilunaris* sensu lato (Bacillariophyta). *Protist* **159**: 73-90.

Van Thor, J.J., Hellingwerf, K.J., and Matthijs, H.C.P. (1998). Characterization and Transcriptional Regulation of the *Synechocystis* PCC 6803 *petH* Gene, Encoding Ferredoxin–NADP⁺ Oxidoreductase: Involvement of a Novel Type of Divergent Operator, *Plant Mol Biol* **36**: 353-363.

Van Thor, J.J., Jeanjean, R., Havaux, M. (2000). Salt Shock-Inducible Photosystem I Cyclic Electron Transfer in *Synechocystis* PCC 6803 Relies on Binding of Ferredoxin: NADP⁺ Reductase to the Thylakoid Membranes via Its CpcD Phycobilisome-Linker Homologous N-Terminal Domain, *Biochim Biophys Acta* **1457**: 129-144.

Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, A.M. and Andersson, B. (1992). Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 1408-1412.

- Vaulot, D., Olson, R.J. and Chisholm, S.W. (1986). Light and dark control of the cell cycle in two phytoplankton species. *Exp Cell Res* **167**: 38-52.
- Vejrazka, C., Janssen, M., Streefland, M. and Wijffels, R.H. (2011). Photosynthetic efficiency of *Chlamydomonas reinhardtii* in flashing light. *Biotechnol Bioeng* doi: 10.1002/bit.23270.
- Véry, A.A., Robinson, M.F., Mansfield, T.A. and Sanders D. (1998). Guard cell cation channels are involved in Na⁺-induced stomatal closure in a halophyte. *Plant J* **14**: 509-521.
- Villareal, T.A. (1989). Division cycles in the nitrogen-fixing *Rhizosolenia* (Bacillariophyceae) *Richelia* (Nostocaceae) symbiosis. *Br Phycol J* **24**: 357-65.
- Villareal, T.A. and Carpenter, E.J. (2003). Buoyancy regulation and the potential for vertical migration in the oceanic cyanobacterium *Trichodesmium*. *Microb Ecol* **45**: 1-10.
- Vonshak, A., R. and Guy. M. (1988). The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. *Arch Microbiol* **150** : 417-420.
- Vonshak, A., Kancharaska, N., Bunnag, B. and Tanticharoen, M. (1996). Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. *J Appl Phycol* **8**: 119-124.
- Vos J, De la Rosa NL (1980). Manual on *Artemia* production in salt ponds in the Philippines. Quezon City. In: BFAR/UNDP/FAO, *Brackishwater Aquaculture and Demonstration Training Project, PHI/75/005, FAO*, Rome p 49.



- Waditee, R., Hibino, T., Tanaka, Y., Nakamura, T., Incharoensakdi, A. and Takabe, T. (2001). Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* Contains an Na⁺/H⁺ Antiporter, Homologous to Eukaryotic Ones, with Novel Ion Specificity Affected by C-terminal Tail. *J Biol Chem* **276**: 36931-36938.
- Waditee, R., Hibino, T., Nakamura, T., Incharoensakdi, A. and Takabe, T. (2002). Overexpression of a Na⁺/H⁺ antiporter confers salt tolerance on a freshwater cyanobacterium, making it capable of growth in sea water. *PNAS* **99**: 4109-4114.
- Wafaa. O.T, Abo El-Kheir, F., Abd El-Hady H.A. and Abd El-Hady HO. (2012). Production of β-carotene and glycerol from *Dunaliella bardawil* and *D. salina* isolated from the Egyptian wet lands Qarun and Bardawil. *International Conference on Ecological, Environmental and Biological Sciences (ICEEBS'2012) Jan. 7-8, 2012 Dubai*.

- Wahidin, S., Idris, A., and Muhamad Shaleh, S.R. (2013).** The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresour Technol* **129**: 7-11.
- Walsby, A.E., Schanz, F. and Schmid, M. (2006).** The Burgundy-blood phenomenon: a model of buoyancy change explains autumnal waterblooms by *Planktothrix rubescens* in Lake Zürich. *New Phytol* **169**: 109-122.
- Wang, G.H., Hao, Z.J., Anken, R.F., Lu, J.Y. and Liu, Y.D. (2010).** Effects of UV-B radiation on photosynthesis activity of *Wolffia arrhiza* as probed by chlorophyll fluorescence transients. *Adv Space Res* **45** (7): 839-845.
- Ward, J.M., Hirschi, K.D. and Sze, H. (2003).** Plants pass the salt. *Trends Plant Sci* **8**: 200-201.
- Ward, O.P. and Singh, A. (2005).** Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochem* **40**: 3627-3652.
- Warr, S.R.C., Reed, R.H. and Stewart, W.D.P. (1985).** Carbohydrate Accumulation in Osmotically Stressed Cyanobacteria (Blue-Green Algae): Interactions of Temperature and Salinity, *New Phytol* **100**: 285-292.
- Waser, M., Hess-Bienz, D., Davies, K. and Solioz, M. (1992).** Cloning and disruption of a putative NaH⁺-antiporter gene of *Enterococcus hirae*. *J Biol Chem* **267**: 5396-5400.
- Watanabe, K. I., Ehara, M., Inagaki, Y. & Ohama, T. (1998).** Distinctive origins of group I introns found in the COXI genes of three green algae. *Gene* **213**: 1-7.
- Weiss, M and Pick, U. (1990).** Transient Na⁺ flux following hyposmotic shock in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *J Plant Physiol* **136**: 429-438.
- Wiangnon, K., Raksajit, W. and Incharoensakdi, A. (2007).** Presence of a Na⁺-stimulated P-type ATPase in the plasma membrane of the alkaliphilic halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *FEMS Microbiol Lett* **270**: 139-145.
- Wilson, K.M., Schembri, M.A., Baker, P.D. and Saint. C.P. (2000).** Molecular Characterization of the Toxic Cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* and Design of a Species-Specific PCR. *Appl Environ Microbiol* **66**: 332-338.
- Woese, C. R. (1987).** Bacterial evolution *Microbiol Rev* **51**: 221-271.
- Wollman, F.A. (2001).** State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J* **20** (14): 3623-3630.
- Wong, C.C., Li, H.B., Cheng, K.W. and Chen, F. (2006).** A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chem* **97**: 705-711.

Wu, L., Ho, J.A., Shieh, M. and Lu, I. (2005). Antioxidant and antiproliferative activities of *Spirulina* and *Chlorella* water extracts. *J Agric Food Chem* **53**: 4207-4212.

Wu, H., Cockshutt, A.M., McCarthy, A. and Campbell, D.A. (2001). Distinctive Photosystem II Photoinactivation and Protein Dynamics in Marine Diatoms. *Plant Physiol* **156** : 2184-2195.

Wutipraditkul, N., Waditee, R., Incharoensakdi, A., Hibino, T., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takabe, T. and Takabe, T. (2005). Halotolerant Cyanobacterium *Aphanothece halophytica* Contains NapA-Type Na^+/H^+ Antiporters with Novel Ion Specificity That Are Involved in Salt Tolerance at Alkaline pH. *Appl Environ Microbiol* **71(8)**: 4176-4184.



Yamashita, T. and Butler, W.L. (1969). Inhibition of the Hill reaction by Tris and restoration by electron donation to photosystem II. *Plant Physiol* **44**: 435-438.

Yao, C.H., Ai, J.N., Cao, X.P. and Xue, S. (2013). Salinity manipulation as an effective method for enhanced starch production in the marine microalga *Tetraselmis subcordiformis*. *Bioresour Technol* **146** : 663-671.

Yeesang, C. and Cheirsilp, B. (2011). Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. *Bioresour Technol* **102**: 3034-3040.

Yin, K., Qian, P.Y., Chen, J.C., Hsieh, D.P.H. and Harrison, P.J. (2000). Dynamics of nutrients and phytoplankton biomass in the Pearl River estuary and adjacent waters of Hong Kong during summer: preliminary evidence for phosphorus and silicon limitation. *Mar Ecol Prog Ser* **194**: 295-305.

Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. and Pardo, J.M. (2002). Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response. *Plant J* **30**: 529-539.

Yokota, A., Shigeoka, S., Onishi, T. and Kitaoka, S. (1988). Selenium as inducer of glutathione peroxidase in low- CO_2 -grown *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **86**: 649-651.

Yoshida, K., Igarashi, E., Wakatsuki, E., Miyamoto, K. and Hirata, K. (2004). Mitigation of osmotic and salt stresses by abscisic acid through reduction of stress-derived oxidative damage in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sci* **167**: 1335-1341.

Yuasa, T. and Muto, S. (1992). Change of protein phosphorylation of *Dunaliella tertiolecta* cells in osmotic shock. In Murata N (ed) *Research in photosynthesis*. Kluwer, Dordrecht, pp 263-266.

Yuasa, T. and Muto, S. (1996). Activation of 40 kDa protein kinases in response to hypo and hyperosmotic shock in the halotolerant green alga *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Cell Physiol* **36**: 699-708.

X

Xue, S., Su, Z. and Cong, W. (2011). Growth of *Spirulina platensis* enhanced under intermittent illumination. *J Biotechnol* **151**(3): 271-277.

Z

Zakhochii, I. G., Matalin, D. A., Popova, L. G. and Balnokin, Y. V. (2012). Responses of Photosynthetic Apparatus of the Halotolerant Microalga *Dunalliella maritima* to Hyperosmotic Salt Shock. *Russ J Plant Physiol* **59** (1) : 42-49.

Zalack, J.T., Smucker, N.J. and Vis, M.L. (2010). Development of a diatom index of biotic integrity for acidmine drainage impacted streams. *Ecol Indic* **10**: 287-295.

Zer, H., Vink, M., Keren, N., Dilly-Hartwig, H.G., Paulsen, H., Herrmann, R.G., Andersson, B. and Ohad, I. (1999). Regulation of thylakoid protein phosphorylation at the substrate level: Reversible light-induced conformational changes expose the phosphorylation site of the light-harvesting complex II. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8277-8282.

Zeng, M.T. and Vonshak, A. (1998). Adaptation of *Spirulina platensis* to salinity-stress. *Comp Biochem Physiol A* **120**: 113-118.

Zeng, J., Yang, C., Song, Q, Jia, L. and Qiu, C. (2013). Growth promotion of microalgae *Dunaliella bardawil* and disruption of microcrystalline cellulose structure by the interactions between cellulose hydrogen bonds and algae exudates: Microcrystalline cellulose in the algae culture medium. *Int Biodeter Biodegr* **77**:72-77.

Zhu, C.J., Lee, Y.K. and Chao, T.M. (1997). Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. *J Appl Phycol* **9**: 451-457.

Zhu, J.K., J. Liu, and L. Xiong. (1998). Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*: evidence of a critical role for potassium nutrition. *Plant Cell* **10**: 1181-1192.

Zhu JK. (2000). Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* **124**: 941-48.

- Zhu, J.K. (2001).** Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* **6**: 66-71.
- Zhu, J.K. (2002).** Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 247-273.
- Zhu, J. K. (2003).** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 441-445.
- Zuber, H. (1986).** Structure of light-harvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. *Trends Biochem Sci* **10**: 414-419.
- Zurzolo, C. and Bowler, C. (2001).** Exploring bioinorganic pattern formation in diatoms. A story of polarized trafficking. *Plant Physiol* **127**: 1339-45.

Annexe



Annexe 1 : Eau de mer artificielle et solutions

Le milieu de culture utilisé est de l'eau de mer artificielle préparée d'après Harrison *et al.* (1980). Deux solutions I et II à volume égal sont préparées et additionnées pour donner le milieu final. A ces deux solutions I et II, des nutriments, des métaux et des vitamines qui sont préparées sous forme de solutions stocks sont ajoutés. L'eau de mer ainsi préparée est conservée à 4 °C. **La concentration en NaCl a été modifiée à 40, 80 et 140 g/L, ce qui correspond à $6,84 \cdot 10^{-1}$; $1,36 \cdot 10^{-1}$ et $2,4 \cdot 10^{-1}$ M**

Solution I:

Sels anhydres	Concentration finale (M)
NaCl	$3,63 \cdot 10^{-1}$
Na ₂ SO ₄	$2,50 \cdot 10^{-2}$
KCl	$8,04 \cdot 10^{-3}$
NaHCO ₃	$2,07 \cdot 10^{-3}$
KBr	$7,25 \cdot 10^{-4}$
H ₃ BO ₃	$3,72 \cdot 10^{-4}$
NaF	$6,57 \cdot 10^{-5}$

Solution II :

Sels hydratés	Concentration finale (M)
MgCl ₂ , 6H ₂ O	$4,12 \cdot 10^{-2}$
CaCl ₂ , 2H ₂ O	$9,40 \cdot 10^{-3}$
SrCl ₂ , 6H ₂ O	$8,20 \cdot 10^{-5}$

Solution stock

Métaux	Concentration finale (M)
FeCl ₃ , 6H ₂ O	$6,56.10^{-6}$
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	$1,49.10^{-5}$
CoSO ₄ , 7H ₂ O	$5,69.10^{-8}$
Na ₂ MoO ₄ , 7H ₂ O	$6,10.10^{-9}$
Na ₂ SeO ₃	$1,00.10^{-9}$
NiCl ₂ , 6H ₂ O	$6,30.10^{-9}$
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	$2,54.10^{-7}$
CuSO ₄ , 5H ₂ O	$3,92.10^{-8}$
MnSO ₄ , H ₂ O	$2,42.10^{-6}$

Nutriments majeurs	Concentration finale (M)
FeNH ₄ -citrate	$1,37.10^{-6}$
NaNO ₃	$5,49.10^{-4}$
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	$2,10.10^{-5}$
Na ₂ SiO ₃ , 9H ₂ O	$1,05.10^{-4}$

Vitamines	Concentration finale (M)
thiamine	$2,97.10^{-7}$
biotine	$4,09.10^{-9}$
B12	$1,47.10^{-9}$
acide nicotinique	$6,50.10^{-10}$
acide folique	$9,06.10^{-9}$
thymine	$9,52.10^{-7}$
ca-d-pantothenate	$8,39.10^{-9}$
inositol	$1,11.10^{-6}$

Annexe 2: composition chimique du milieu Walne modifié (1991)

Solution n° 1	Métaux	vitamines
H ₂ O 4 L	H ₂ O 200 ml	Vit. B ₁₂ 0,04g
NaNO ₃ 400g	ZnCl ₂ 4g	Vit. B ₁ 0,8 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 80g	COCl ₂ ·6H ₂ O 4g	Biotine 0,01g
H ₃ BO ₃ 140g	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O 1.8g	
EDTA- Na 180g	CuSO ₄ ·5H ₂ O 4g	
FeCl ₃ ·6H ₂ O 5,2g		
MnCl ₂ ·4H ₂ O 1,44g		
NH ₄ Cl ₂ 0,4g		

Le milieu walne modifié est ainsi formé par le mélange de:

Solution n°1 + Vitamines + 4 ml métaux

Annexe 3 : Composition des milieux utilisés pour contrôler l'axénie des cultures de microalgues.

1. FAG

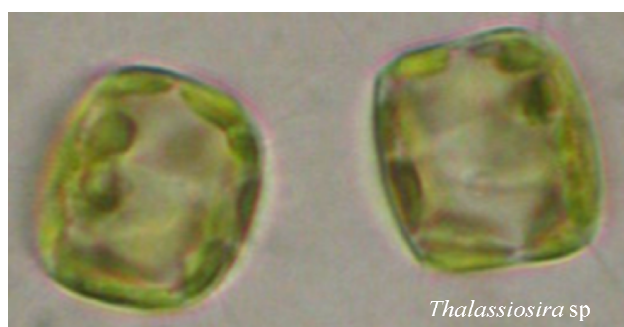
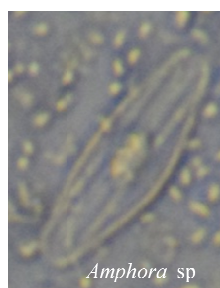
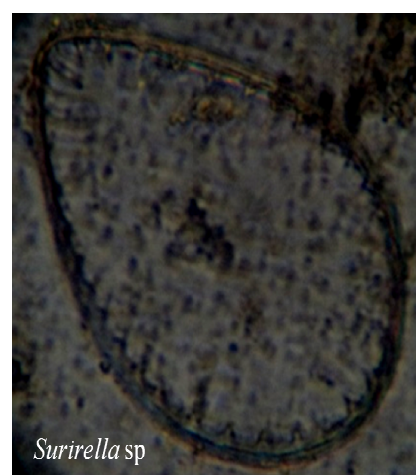
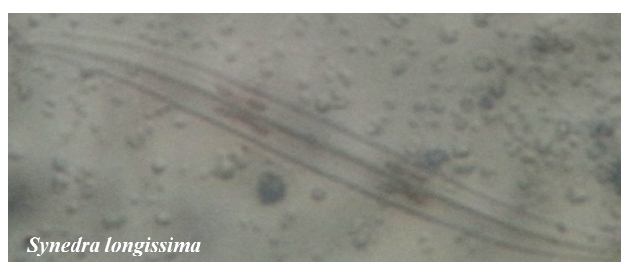
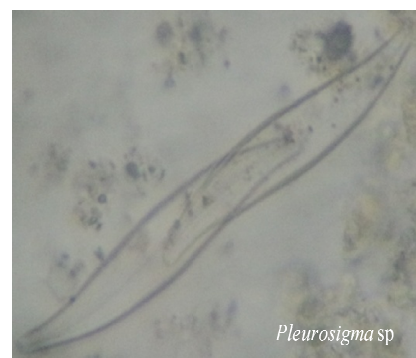
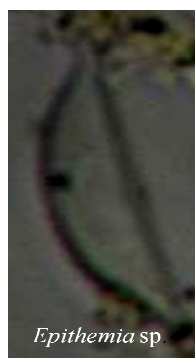
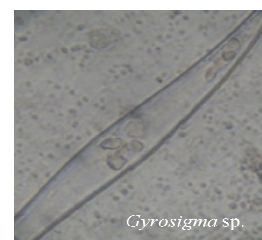
Bacto-peptone	3 g
Extrait de levure	1 g
(NH ₄) SO ₄ 1 g	
Glycérophosphate de Na	25 mg
Fer sequestrène (EDTA ferrique)	6 mg
Eau de mer 50 % qsp	1 litre
pH entre 7,4 et 7,8	

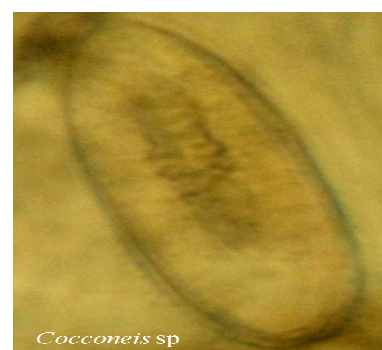
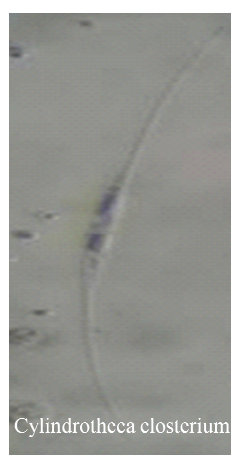
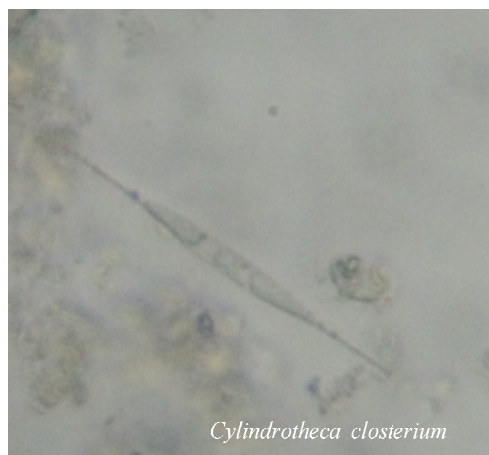
2. FG

Bacto-peptone	4 g
Extrait de levure	0,5 g
Glycérophosphate de Na	25 mg
Fer sequestrène (EDTA ferrique)	6 mg
Eau de mer 75 % qsp	1 litre
pH entre 7,4 et 7,8	

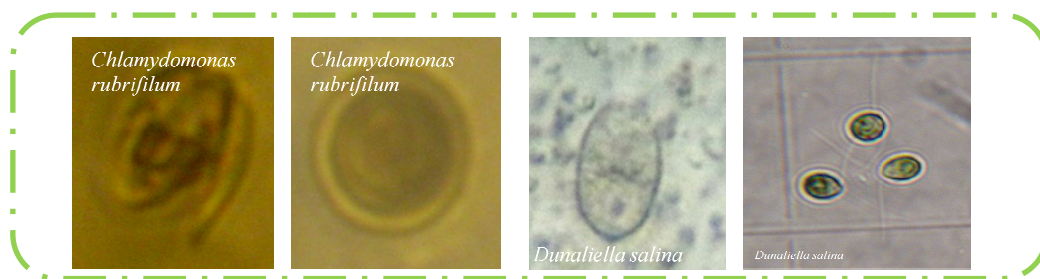
Dissoudre la bacto-peptone dans un peu d'eau de mer. Ajouter l'extrait de levure et les autres produits en solution dans l'eau de mer. Ajuster le pH, répartir dans les tubes à essai et stériliser.

Annexe 4 : Phytoplanctons de la saline de Sfax

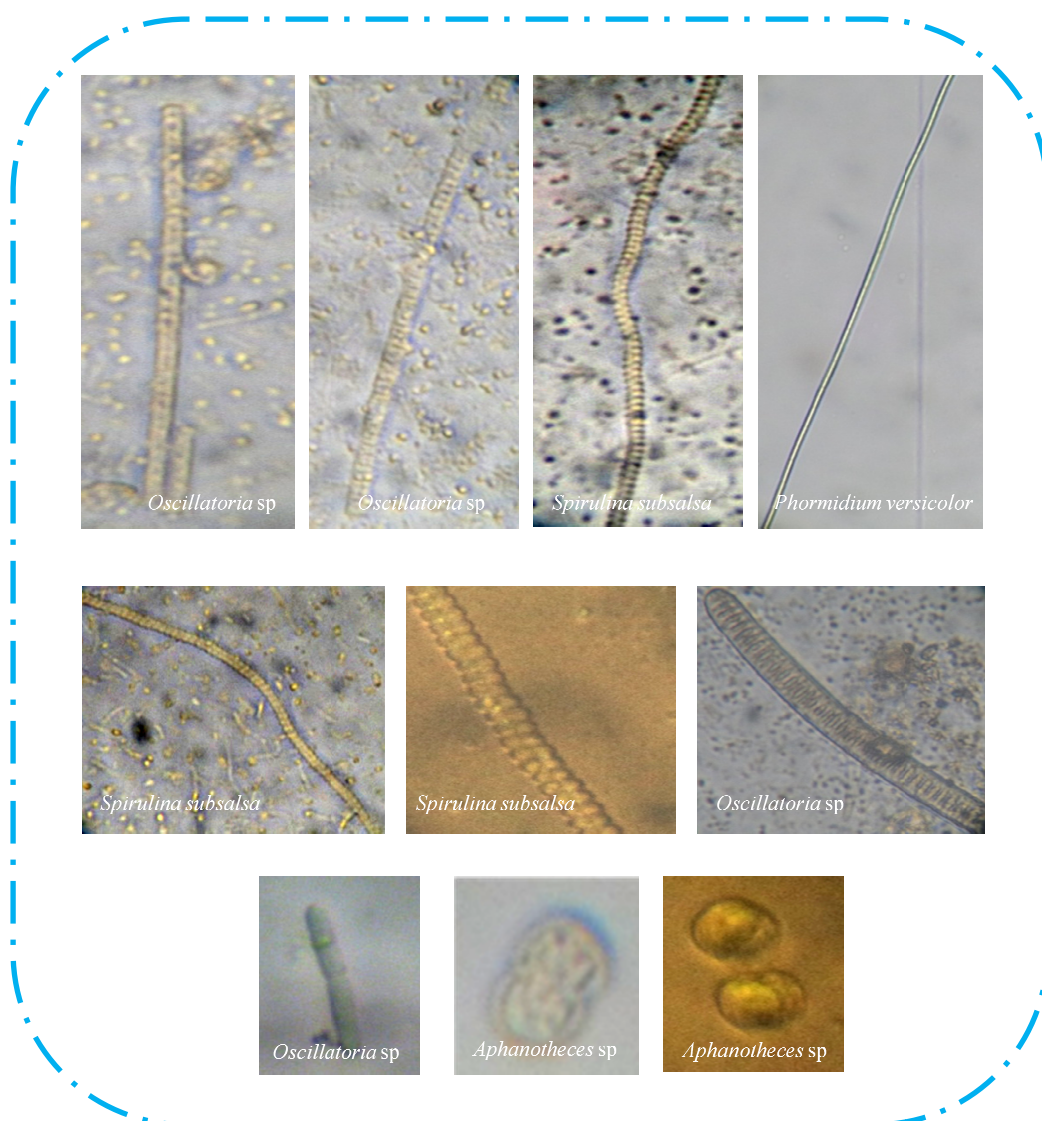




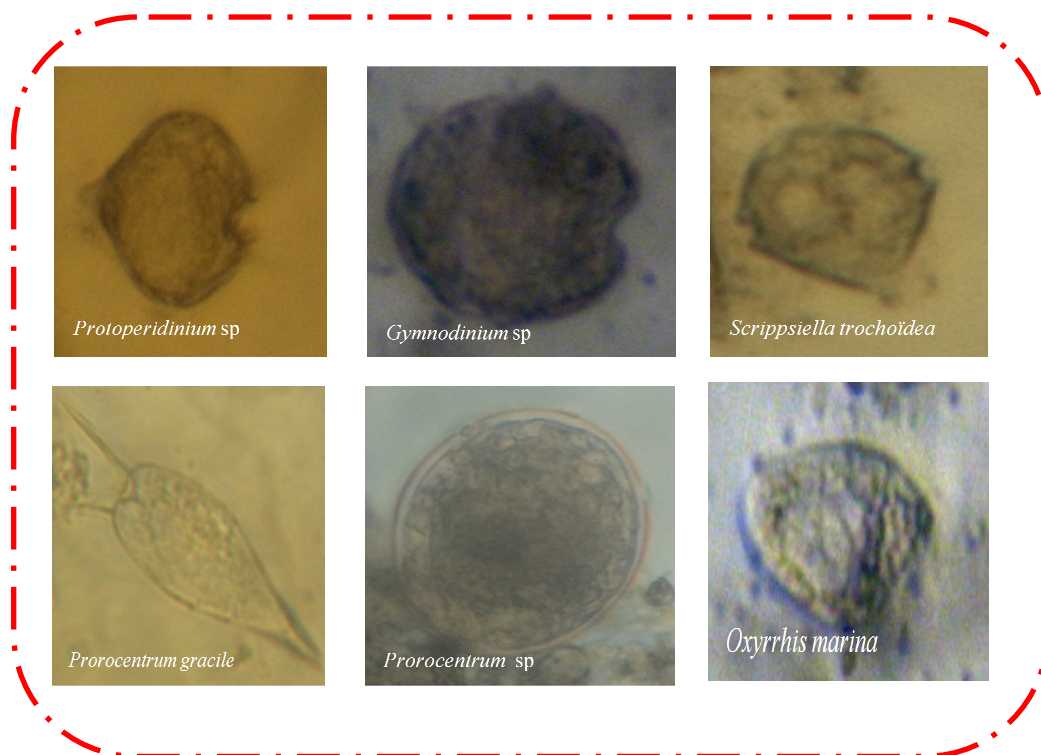
Bacillariophyceae



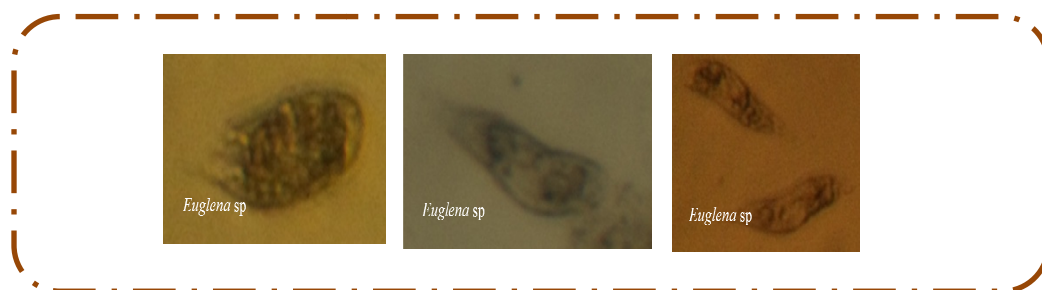
Chlorophyceae



Cyanophyceae



Dinophyta



Euglenophyceae

PUBLICATIONS et COMMUNICATIONS



PUBLICATIONS

1- Salma Masmoudi, The Le Nhung Nguyen-Deroche, Aurore Caruso, Habib Ayadi, Annick Morant-Manceau, Gérard Tremblin, Martine Bertrand, Benoît Schoefs. Cadmium, copper, sodium and zinc effects on diatoms: from heaven to hell. *Cryptogamie - Algologie*. 34 (2), 185-225, 2013. (IF 1, 17).

2- Wassim Guerhazi, Salma Masmoudi, Saoussen Boukhris, Habib Ayadi, Annick Morant-Manceau. Under low irradiation the light regime modifies growth and metabolite production in various species of microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 10.1007/s10811-014-0260-3. (IF 2,497 ; Salma MASMOUDI est co-auteur).

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

1. **Salma MASMOUDI**, Wassim GUERMAZI, Rayda KOBBI, Jannet ELLOUMI, Abderrahmen BOUAIN & Habib AYADI. Etude du cycle de croissance de *Dunaliella salina* à différentes salinités en culture discontinue. 11èmes Journées Tunisiennes des Sciences de la Mer, 19- 22 décembre 2009, Nabeul (Tunisie). (Poster).

2. **Salma MASMOUDI**, Ismail Sabeur HAMZA, Wassim GUERMAZI, Aurore CARUSO, Annick MORANT-MANCEAU & Habib AYADI, 2011. Dynamique des peuplements de diatomées dans différents bassins de la saline de Sfax (Tunisie) pendant une saison estivale. 30ème Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), 6-8 septembre 2011, Boulogne-sur-Mer (France). (Poster).

3. **Salma MASMOUDI**, Ismail Sabeur HAMZA, Wassim GUERMAZI, Aurore CARUSO, Annick MORANT-MANCEAU & Habib AYADI, 2011. Dynamique des peuplements de diatomées dans différents bassins de la saline de Sfax (Tunisie) pendant une saison estivale. 1^{ères} journées scientifiques de l'école doctorale VENAM, 20-21 octobre 2011, Angers (France). (Poster).

4. **Salma MASMOUDI**, Adil HAIMEUR, Vergine MIMOUNI, Aurore CARUSO, Lionel ULMANN, Habib AYADI, Nadia MESKINI, Benoit SCHOEFS, Gérard TREMBLIN, Annick MORANT-MANCEAU. Les microalgues comme source de lipide, d'oméga3 et de pigments. 1^{ères} journées internationales : Phototrophes Aquatiques et biotechnologie, du 31 Mars au 2 Avril 2012, Sousse (Tunisie). (Conférence invitée).

5. **Salma MASMOUDI**, Hajer Kemakem, Elloumi Jannet, Wassim GUERMAZI, Aurore CARUSO, Annick MORANT-MANCEAU & Habib AYADI, 2012. Dynamique interannuelles des diatomées dans deux bassins de salinité contrastées d'un biotope extrêmophile : la saline de Sfax. 31ème Colloque de l'Association des Diatomistes de Langue Française (ADLaF), 11-13 septembre 2012, Université du Maine, Le Mans (France). (Poster).

6. **Salma MASMOUDI**, Wassim Guerhazi, Habib Ayadi, Annick Morant-Manceau, Aurore Caruso. Recherche d'un antiport H^+/Na^+ de type SOS1 chez trois espèces phytoplanctoniques isolées de la saline de Sfax (Tunisie). 14èmes Journées Tunisiennes des Sciences de la Mer, 15 au 18 Décembre 2012, Hammamet (Tunisie). (Poster).

7. **Salma MASMOUDI**, Wassim Guerhazi, Habib Ayadi, Annick Morant-Manceau et Aurore Caruso. Identification moléculaire de *Dunaliella salina*, *Cylindrotheca closterium* et *Phormidium versicolor* de la saline de Sfax (Tunisie). 24^{ème} Congrès de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB), 25 au 28 Mars 2013, Sousse (Tunisie). (Communication orale).

8. **Salma MASMOUDI**, Aurore Caruso, Habib Ayadi et Annick Morant-Manceau. Impact du NaCl et de l'éclairement sur l'activité photosynthétique de deux microalgues et d'une cyanobactérie isolées de la saline de Sfax (Tunisie). 2^{ème} Journées Internationales « Phototrophes Aquatiques et biotechnologie », 30 Mars au 1 Avril 2014, Mahdia (Tunisie). (Communication orale).

Formation thématique de l'ED VENAM

« Techniques de mesure de l'activité photosynthétique : du laboratoire au terrain » organisée par l'université du Maine. 3 décembre 2010, Le Mans (France).

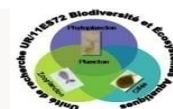
Autres formations

- Formation en Statistique organisé par INCOMMET, Salammbô, Tunisie. 29 Octobre -2 Novembre 2012.

- Workshop « le phytoplancton : potentialité d'exploitation » organisé par la Faculté des Sciences de Sfax. 13 Décembre 2013.

Thèse de Doctorat

Salma MASMOUDI



Dynamique du phytoplancton et caractérisation physiologique et moléculaire de trois espèces autotrophes de la saline de Sfax(Tunisie), un milieu extrêmophile

Phytoplankton dynamics, physiological and molecular characterization of three autotrophic species from the solar saltern of Sfax (Tunisia), an extremophile environment

Résumé

La saline de Sfax est un environnement thalasso halin (milieu salé alimenté par de l'eau de mer) riche en plancton malgré la contrainte du sel et l'intensité lumineuse élevée. Cette richesse est due à ses facteurs physico-chimiques particuliers. L'analyse STATICO a mis en évidence que l'azote et le phosphore peuvent influencer la distribution du phytoplancton en plus de la salinité qui domine dans ce milieu particulier. En se basant sur ce dernier paramètre, nous avons pu regrouper les espèces selon leur tolérance au sel. Afin de mieux comprendre le comportement du phytoplancton, trois espèces autotrophes *Dunaliella salina* (Chlorophycée), *Cylindrotheca closterium* (diatomée) et *Phormidium versicolor* (Cyanophycée) ont été isolées, identifiées puis cultivées en batch dans de l'eau de mer artificielle sous trois niveaux d'éclairement et en présence de trois concentrations en NaCl. La croissance, l'activité photosynthétique ainsi que l'activité enzymatique anti-oxydante ont été mesurées. L'appareil photosynthétique de la Chlorophycée et de la cyanobactérie est moins affecté que celui de la diatomée qui est irréversiblement altéré aux forts éclaircements et à la plus forte salinité; l'activité anti-oxydante n'a été détectée que sous l'éclairement le plus élevé et la synthèse des pigments caroténoïdes, qui sont des anti-oxydants non enzymatiques, est fortement activée surtout chez *D.salina*. La salinité et le niveau d'éclairement inter-réagissent sur la physiologie des trois espèces qui possèdent des mécanismes de résistance aux stress plus ou moins efficaces, d'où des résistances différentes aux contraintes du milieu selon les espèces.

Mots clés

Saline – photosynthèse – stress - *D.salina*-
C. closterium - *P. versicolor*

Abstract

The saltern of Sfax is a thalasso haline environment (salt medium supplied with sea water) plankton-rich despite the high salinity and the high light intensity. This richness is due to its physico- chemical characteristics. The STATICO analysis shows that nitrogen and phosphorus can influence the distribution of the phytoplankton in addition to salinity that dominates in this peculiar medium. Basing on this parameter, we could group the species according to their salt tolerance. To better understand the behavior of the phytoplankton, three autotrophic species *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) *Cylindrotheca closterium* (diatom) and *Phormidiumversicolor* (Cyanophyceae) were isolated, identified and grown in batch in artificial seawater in the presence of three NaCl concentrations and under three irradiances. Growth, photosynthesis and antioxidant enzyme activity were measured. The photosynthetic apparatus of the Chlorophyceae and the cyanobacterium was less affected than the diatom's one that was irreversibly altered under high illumination and the highest salinity ; the antioxidant activity was only detected in cells grown under the highest irradiance, and the synthesis of carotenoid pigments, that are non-enzymatic antioxidants, was strongly activated especially in *D.salina*. Salinity and light inter-reacted on the physiology of the three species that possess resistance mechanisms to stresses more or less effective, resulting in different resistance to environmental stresses depending on species.

Key Words

Solar saltern – photosynthesis – stress - *D.salina*-
C. closterium - *P. versicolor*